

# Multivalente Liganden mit Anionen- Bindungsmotiv als Stabilisatoren von Protein- Protein-Interaktionen und als Transfektionsvektoren

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von Master of Science

**Lina Bartsch**

geboren in Greven

Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen

Essen 2017



## Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2011 bis Juli 2017 am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck durchgeführt.

Hiermit erkläre ich des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit

„Multivalente Liganden mit Anionen-Bindungsmotiv als Stabilisatoren von Protein-Protein-Interaktionen und als Transfektionsvektoren“

selbst verfasst und mich dabei keinen anderen als den von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Essen, im Juli 2017

---

Lina Bartsch





Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmuck

Prof. Dr. Shirley Knauer

Vorsitzende: Prof. Dr. Elke Sumfleth

Tag der Disputation: 11.10.2017



Alice came to a fork in the road. »Which road do I take?« she asked.

»Where do you want to go?« responded the Cheshire cat.

»I don't know,« Alice answered.

»Then," said the cat, »it doesn't matter.«

Lewis Carroll



## Danksagung

Vor nunmehr sechs Jahren purzelte ich durch einen Kanninchenbau in das Wunderland Promotion. Dort lernte ich nicht nur mit der seltsamen und wundersamen Chemie umzugehen, sondern auch gegen die böse Königin Frust anzugehen und die Tücken dieser Welt zu meistern. Während meiner Reise haben mich stets Menschen mit Rat und Tat unterstützend (manchmal nur ein Stückchen) auf dem Weg begleitet. Diesen Meschen möchte ich meinen Dank aussprechen.

Auf den Weg brachte mich mein Doktorvater Carsten Schmuck, dem ich für die interessante Themenstellung und die Schubser, die mich nicht zu sehr vom Weg abkommen ließen, danken möchte.

Shirley Knauer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und dass ich einen kleinen Umweg durch ihre Labore nehmen durfte.

Neue Wege wurden mir durch meine Kooperationspartner geebnet. Daher danke ich Christian Ottmann und seinen Mitarbeitern Maria Bartel und Jeroen Briels für ihre Zusammenarbeit am 14-3-3-Projekt. In den Laboren von Eindhoven arbeiten zu dürfen war eine bereichernde Erfahrung für mich. Während des Transfektionsprojekts stand mir Sandra Bäcker aus der Knauer-Arbeitsgruppe als Ansprechpartnerin bereit. Ein großer Dank hierfür. Elsa Sanchez-Garcia und ihrem Team, allen voran Niklas Tötsch und Javier Iglesias möchte ich für die QM-Rechnungen als Bereicherung des 14-3-3-Projekts danken. Christine Beuck aus dem AK Bayer möchte ich herzlich für ihre Hilfe und Beratung bei den PAGE-Experimenten danken. Großzügigerweise durfte ich hierfür in den Laboren von Peter Bayer arbeiten. Robert Pöhler aus dem AK Meyer danke ich für die ITC-Einweisung und Hemmo Meyer für die Nutzung der ITC.

Für die Aufnahmen der Massenspektren meiner Liganden danke ich Werner Karow und Gudrun Heinrich.

Heinz Bandmann, Thorsten Schaller und Felix Niemeyer danke ich die Aufnahmen der NMR Spektren.

Ein ganz besonderer Dank geht an Hannes Korth, der nicht nur das Korrekturlesen dieser Arbeit übernommen hat, sondern mir stets mit seinen lustigen Geschichten den Tag verschönt hat.

Dem ganzen AK Schmuck danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Johannes, Alba und Qian-Qian. Ein besonders herzlicher Dank geht an die guten Seelen des AKs: Elisabeth (die weiße GCP-Königin), Pia (meine HPLC-Mitstreiterin), Ulla (die Screening und Spektrometer Beschwörerin) und Christine (wohl eher bekannt unter AK-Mutti). Für eine tolle Zeite möchte ich meinen Laborkollegen Anja, Christian, Kerstin und Ina danken, die meine Laboralltagslaunen mit durchleben mussten und mir so manchen Tag gerettet haben.

Für eine phantasiatastische Zeit danke ich Jule und Jule (danke auch an beide für das Korrekturlesen), Kerstin und Sandra. Sandra du hast mich seit dem Studium ertragen. Danke, dass du immer meine Laborpartnerin geblieben bist.

Der größte und herzlichste Dank geht jedoch an meine Freunde, meine Familie und insbesondere an meine Eltern Heidi und Hubert. Ich bin nur durch euch am Ende dieser Reise angekommen.

*meinen Eltern*





## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>HINTERGRUND .....</b>	<b>3</b>
2.1.	MOLEKULARE ERKENNUNG VON OXO-ANIONEN DURCH GCP .....	3
2.2.	PROTEIN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN .....	11
2.2.1.	<i>Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen .....</i>	<i>12</i>
2.2.1.1.	PPI-Disruptoren .....	13
2.2.1.2.	PPI-Stabilisatoren .....	18
2.2.2.	<i>14-3-3-Proteine .....</i>	<i>21</i>
2.2.2.1.	14-3-3-C-RAF-Wechselwirkung .....	26
2.2.2.2.	14-3-3-Tau Protein-Wechselwirkung .....	28
2.2.2.3.	Modulatoren von 14-3-3-Wechselwirkungen .....	30
2.3.	GENTRANSFEKTION .....	36
2.3.1.	<i>Transport und Transporthindernisse von Nukleinsäuren .....</i>	<i>37</i>
2.3.2.	<i>Transfektionsvektoren .....</i>	<i>40</i>
<b>3.</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>49</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
4.1.	SYNTHESE DER MULTIVALENTEN LIGANDEN .....	53
4.1.1.	<i>Einarmiger Ligand .....</i>	<i>56</i>
4.1.2.	<i>Zweiarmiger Ligand .....</i>	<i>58</i>
4.1.3.	<i>Dreiarmige Liganden .....</i>	<i>58</i>
4.1.4.	<i>Vierarmige Liganden .....</i>	<i>60</i>
4.2.	MULTIVALENTE LIGANDEN ALS STABILISATOREN VON 14-3-3Z-PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN .....	66
4.2.1.	<i>PPI-Modulation durch multivalente Liganden .....</i>	<i>67</i>
4.2.1.1.	Fluoreszenzpolarisations-Messungen .....	68
4.2.2.	<i>GCP im Vergleich mit den natürlichen Aminosäuren Arginin und Lysin .....</i>	<i>75</i>
4.2.2.1.	Fluoreszenzpolarisations-Messungen .....	76
4.2.2.2.	Einfluss des Protonierungsgrads .....	79
4.2.2.3.	Einfluss der Peptidsequenz .....	82
4.2.2.4.	ITC-Messungen .....	85
4.2.2.5.	DLS-Messungen .....	90
4.2.2.6.	Gel-Elektrophorese .....	95
4.2.2.7.	Erste Hinweise auf den Bindungsort .....	100
4.2.3.	<i>Zusammenfassung PPI-Stabilisierung durch multivalente Liganden .....</i>	<i>103</i>
4.3.	MULTIVALENTE LIGANDEN ALS TRANSFEKTIONSVEKTOREN .....	106
4.3.1.	<i>Multivalente Liganden .....</i>	<i>106</i>

4.3.1.1.	DNS-Bindungsuntersuchung.....	107
4.3.1.2.	Transfektionsuntersuchung.....	110
4.3.1.3.	Zellviabilitätstest .....	117
4.3.1.4.	Variation der Peptidsequenz .....	118
4.3.2.	<i>Zusammenfassung DNS-Bindung und -transfektion durch multivalente Liganden .....</i>	<i>124</i>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>134</b>
<b>7.</b>	<b>EXPERIMENTALTEIL.....</b>	<b>141</b>
7.1.	MATERIAL UND GERÄTE.....	141
7.2.	METHODEN.....	146
7.2.1.	<i>Fluoreszenzpolarisation .....</i>	<i>146</i>
7.2.2.	<i>Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) .....</i>	<i>148</i>
7.2.3.	<i>Gelelektrophorese.....</i>	<i>149</i>
7.2.4.	<i>AFM-Messungen.....</i>	<i>152</i>
7.2.5.	<i>DLS-Messungen .....</i>	<i>152</i>
7.2.6.	<i>EB-Verdrängungsassay.....</i>	<i>153</i>
7.2.7.	<i>Transfektions-Assay.....</i>	<i>153</i>
7.2.8.	<i>Alamar-Blue-Assay .....</i>	<i>154</i>
7.3.	SYNTHESEN .....	155
7.3.1.	<i>GCP .....</i>	<i>155</i>
7.3.2.	<i>Festphasenpeptidsynthese .....</i>	<i>162</i>
7.3.2.1.	Allgemeine Vorgehensweise .....	162
7.3.2.2.	GCP-Phe-Lys-Gly-NH <sub>2</sub> ( <b>57</b> ) .....	165
7.3.2.3.	(GCP-Phe-Lys-Gly) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>58</b> ) .....	167
7.3.2.4.	(GCP-Phe-Lys-Gly) <sub>3</sub> -(Lys)-Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>59</b> ).....	169
7.3.2.5.	(GCP-Lys-Phe-Gly) <sub>3</sub> -(Lys)-Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>61</b> ).....	172
7.3.2.6.	(GCP-Phe-Lys-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>45</b> ) .....	174
7.3.2.7.	(GCP-Lys-Phe-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>62</b> ) .....	177
7.3.2.8.	(Arg-Phe-Lys-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>72</b> ) .....	180
7.3.2.9.	(Lys-Phe-Lys-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>73</b> ) .....	183
7.3.2.10.	(Arg-Trp-Lys-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>75</b> ) .....	186
7.3.2.11.	(GCP-Trp-Lys-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>76</b> ) .....	189
7.3.2.12.	(GCP-Lys-Trp-Lys-Gly) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-NH <sub>2</sub> ( <b>77</b> ) .....	191
<b>8.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>193</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>209</b>
9.1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	209

9.2.	HPLC-LÄUFE .....	212
9.3.	FLUORESZENZPOLARISATION .....	216
9.4.	ITC-KONTROLLEXPERIMENTE .....	216
9.5.	TRANSFEKTION .....	217
9.6.	LEBENS LAUF.....	230



# 1. Einleitung

---

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört“*, sinnierte einst *Justus von Liebig* in seinen „Chemischen Briefen“, die er seit 1841 in der Augsburger Allgemeinen Zeitung veröffentlichte, um Chemie und chemische Themen einem breiten Publikum verständlich und unterhaltend näher zu bringen.<sup>[1]</sup> Was damals zu *Liebigs* Zeiten schon galt, gilt noch heute. Jede neue Erkenntnis in der Forschung wirft neue Fragen auf; der Prozess scheint endlos und immer detaillierter. Biologische Prozesse beispielsweise sollen auf molekularer Ebene beobachtet, simuliert, verstanden und zielgerichtet beeinflusst werden, um gegen Krankheiten vorzugehen, die auf eine Fehlfunktion in einem solchen Prozess zurückzuführen sind. So werden neue Themengebiete generiert und alte entwachsen ihren Kinderschuhen. An dieser Stelle seien die beiden biologische Prozesse – Protein-Protein-Interaktion und Gentransfektion – vorgestellt, die im Verlauf der Arbeit thematisiert werden.

Einfluss zu nehmen auf die Wechselwirkung zwischen zwei (verschiedenen) Proteinen ist noch ein relativ junges Forschungsfeld bei der Entwicklung neuer pharmakologischer Wirkstoffe, deren Bedarf mit der Identifikation und immer differenzierteren Beschreibung von Krankheitsursachen auf molekularer Ebene, z. B. bei verschiedenen Krebsarten, stetig ansteigt. Von den tausenden, bekannten Protein-Protein-Interaktionen (PPI), wurde gerade die Spitze des Eisbergs konkret untersucht und erfolgreich beeinflusst. Die Modulation – Disruption und insbesondere Stabilisierung – von solchen PPI steckt entsprechend noch in den Kinderschuhen. Dazu stellt jede PPI ein einzelnes Ziel dar, das bei der Entwicklung zielgerichteter Modulatoren gesondert betrachtet werden muss. Basis für die Entwicklung bzw. Weiterentwicklung von sogenannten Leitstrukturen ist die molekulare Erkennung der Proteinoberfläche(n) bzw. den Aminosäureresten, die diese Oberflächen bilden, da dort die Wechselwirkung des Modulators mit dem Protein stattfindet. In der Literatur werden zumeist Naturstoffe als Modulatoren beschrieben, die zufällig

durch Screening großer Substanzbibliotheken gefunden wurden. Diese Naturstoffe müssen dann aufwendig nachsynthetisiert und gegebenenfalls derivatisiert werden. Eine einfache Alternative stellt die Entwicklung gezielt entworfener Liganden für die Modulation von PPI dar.

Etabliert ist dagegen die Erkennung und Bindung von Nukleinsäuren. Nachdem es fast schon einfach erscheint, über elektrostatische Wechselwirkung an das Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren zu binden, gilt es nach wie vor als herausfordernd diese Komplexe aus Nukleinsäure und bindenden Ligand ins Zellinnere zu transportieren und so die Proteinproduktion von Zellen zu beeinflussen. Dieser Vorgang, Gene oder genetisches Material in eukaryotischen Zellen einzuschleusen, wird als Gentransfektion bezeichnet. Wird dabei das Ziel verfolgt einen therapeutischen Nutzen zu erhalten, spricht man von Gentherapie. Man will demnach nicht weniger als die genetische Ursache von Krankheiten angehen. Ein Ziel, das ambitioniert und von Rückschlägen gezeichnet ist. Die Suche nach effizienten nicht-viralen Genfähern (auch Vektoren genannt) ist aufgrund der Komplexität des Transportvorgangs noch lange nicht abgeschlossen.

Sowohl die Interaktion der Modulatoren mit Proteinoberflächen als auch die Komplexierung von genetischem Material durch Transfektionsvektoren basiert auf molekularen Erkennungsprozessen. Diese Erkennung ist auf nicht-kovalente Wechselwirkung, wie z. B. zwischen Carboxylat-Anionen und Guanidinium-Kationen oder Wasserstoffbrückenbindungen, zurückzuführen und stellt ein Grundkonzept der supramolekularen Chemie dar. Als Teil dieser Arbeit sollen künstliche, supramolekulare Liganden entwickelt und hergestellt werden, die in den beschriebenen biologischen Prozesse entweder als Modulator oder Vektor eingesetzt werden können. Diese Liganden sollen durch die Verknüpfung von natürlichen Aminosäuren peptidisch aufgebaut werden, wobei das Baukastenprinzip gleichzeitig eine einfache Synthesestrategie und so auch eine einfache Variation der Liganden ermöglicht. Als weiterer nicht-natürlicher Baustein soll das speziell für die Bindung von Anionen entwickelte Bindungsmotiv Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP) in die Liganden eingebaut werden. Gleichzeitig sollen die Bindungseigenschaften der Liganden über multivalente, nicht-kovalente Bindungen verbessert werden. Daraus resultieren rational entworfene Liganden, die durch Kombination von Multivalenz und künstlicher Anionen-Erkennungseinheit, effektiv sowohl Proteinoberflächen als auch Nukleinsäuren binden sollen. Deren Potential, als supramolekulare Werkzeuge zur Untersuchung biochemischer Prozesse von der Ebene der Anionen-Erkennung bis hin zu der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen und der Gentransfektion Anwendung zu finden, soll in dieser Arbeit untersucht und aufgezeigt werden.

## 2. Hintergrund

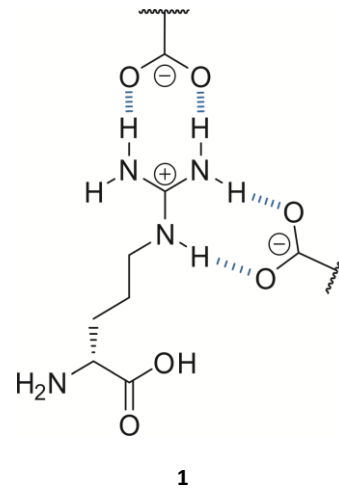
---

Beginnend werden in diesem Kapitel die Hintergrundinformationen vorgestellt, auf deren Basis die Liganden für die Modulation von PPI und für die Transfektion von genetischen Material entwickelt wurden und wo die Forschung dieser Arbeit anknüpft. In dem Unterkapitel *Molekulare Erkennung von Oxo-Anionen durch GCP* wird das Potential von künstlichen Erkennungseinheiten (mit Fokus auf dem GCP-Bindungsmotiv) anhand der Entwicklung rational entwickelter Liganden, sowohl für die Bindung von einfachen Aminosäuren bis hin zu Erkennung komplexer Proteinoberflächen, als auch für die Bindung einfacher Nukleotide und komplexer DNS, aufgezeigt. Daran anschließend wird ein detaillierter Einblick in die aktuelle und vor allem junge Forschung zu *Modulation von PPI* gegeben, dessen Hauptaugenmerk bei der Beschreibung der Interaktionen des 14-3-3-Proteins mit Partnerproteinen – insbesondere mit C-RAF und Tau Protein – liegt, die Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind. Abschließend wird in dem Unterkapitel *Gentransfektion* die gängige Theorie zum Transport von Nukleinsäuren in Zellen vorgestellt, wobei hier gleichzeitig auf die Hindernisse bei dem Transportvorgang eingegangen wird. Die zum Schluss beschriebenen Transfektionsvektoren (oder auch Genfähren) legen dar, wie die Forscher versuchen diese Transporthindernisse zu umgehen und wie herausfordernd es nach wie vor ist, effiziente nicht-virale Vektoren zu entwickeln. Die in dieser Arbeit verwendeten Genfähren stellen sich ebendiesen Hürden. Doch vorab wechelswirken diese künstlichen Genfähren mit dem zu transportierenden genetischen Material über molekulare Erkennungsprozesse.

### 2.1. Molekulare Erkennung von Oxo-Anionen durch GCP

Organisiertes Molekülverhalten – für das *J.-M. Lehn* den Begriff „supramolekulare Chemie“ maßgeblich prägte – ist in der Natur seit jeher zu finden. So basieren Aufbau und Struktur von Proteinen und DNS, Protein-Protein- und Protein-DNS-Interaktionen auf dem Prinzip, dass die

Information zur Ausbildung dieser Strukturen oder zur Umsetzung von Aufgaben gespeichert (z. B. in der Aminosäuresequenz von Proteinen) und abgerufen wird, indem geeignete Molekül(teil)e erkannt werden. Bei all dem handelt es sich vereinfacht um die Bildung von spezifischen und selektiven intra- und intermolekularen Komplexen. Die **molekularen Erkennungsprozesse**, die für diese Komplexbildung nötig sind, werden dabei durch verschiedene **nicht-kovalente Wechselwirkungen**, wie Elektrostatik, Ion-Dipol-, Dipol-Dipol-Interaktionen, insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen (WBB), sowie

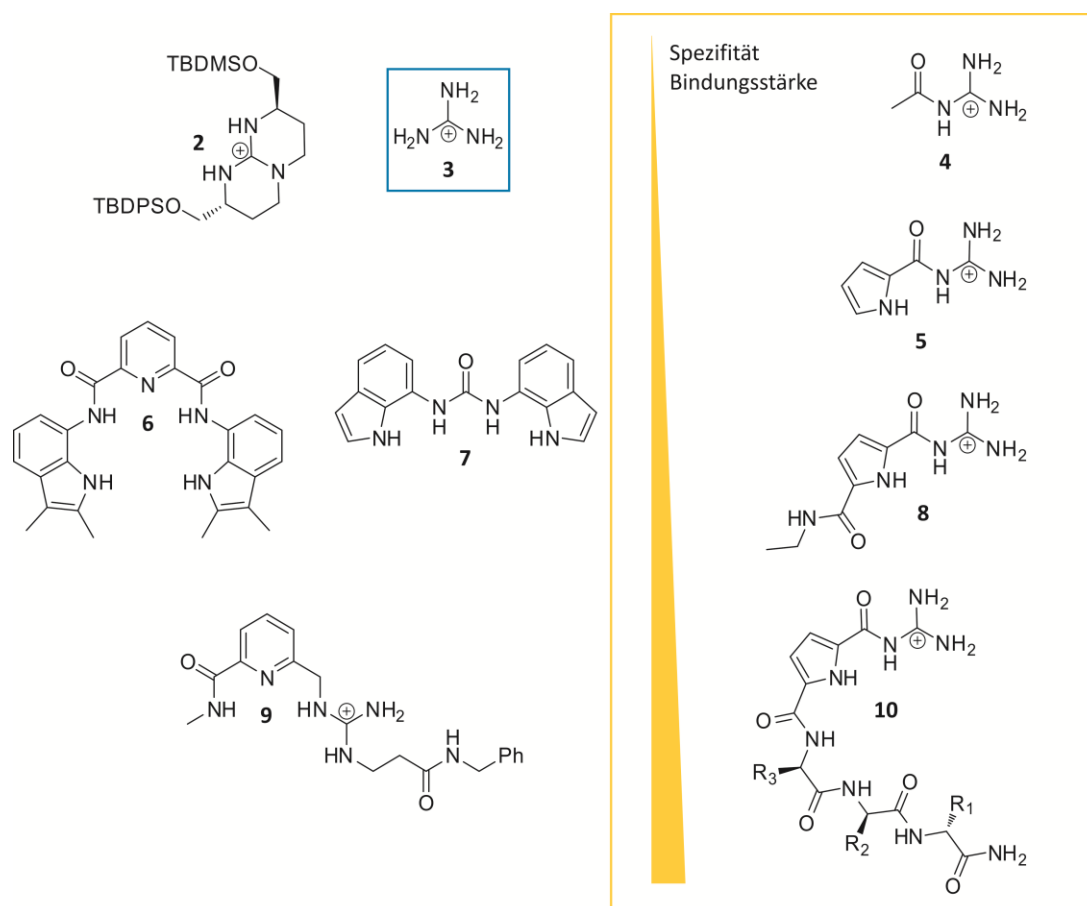


**Abbildung 1.** Arginin (**1**): Die Guanidinium-Funktion kann mit Carboxylaten interagieren.

hydrophobe- oder  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen, vermittelt. Erst durch die Kombination der verschiedenen Wechselwirkungen erlangen die Komplexe ihre individuelle Stabilität. Allerdings hängt die Stärke der einzelnen Wechselwirkung wiederum von äußeren Faktoren wie Polarität und Zusammensetzung des Lösungsmittels oder der Temperatur ab.<sup>[2–7]</sup> Wasser ist das Lösungsmittel des Lebens, in dem hydrophobe Wechselwirkungen relativ stark sind und elektrostatische Interaktionen vergleichsweise schwach.<sup>[6]</sup> Ein wichtiger biochemischer Erkennungsprozess beruht auf der **Wechselwirkung von Oxo-Anionen und Guanidinium-Kationen**. Die Kombination von Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen macht die natürliche Aminosäure **L-Arginin (1)** zu einer wichtigen Erkennungseinheit von Carboxylaten, Phosphaten und anderen Oxo-Anionen. L-Arginin wirkt also häufig entscheidend bei verschiedensten Komplexbildungsprozessen von Proteinen mit anderen Interaktionspartnern mit, wie der Bindung anderer Proteine, Nukleinsäuren oder Kohlenhydraten, der Zellkommunikation, den intrazellulären Signaltransduktionswegen und der Kontrolle von Transkription und Translation. Die Ausbildung von intramolekularen Salzbrücken wiederum unterstützt die Tertiärstruktur von Proteinen.<sup>[8–10]</sup> L-Arginin gehört zu den basischen Aminosäuren mit Alkylguanidin als Seitenkette. Der  $pK_s$ -Wert des Guanidins liegt bei 12–13<sup>[11]</sup> und die Guanidinium-Funktion ist somit bei physiologischen pH-Wert von 7.4 positiv geladen. Durch die planare Anordnung der Guanidingruppe ist die positive Ladung gleichmäßig über die drei Stickstoffatome delokalisiert. Außerdem ermöglicht die Anordnung die Ausbildung von gerichteten bidentaten Wasserstoffbrücken.<sup>[9,10,12–14]</sup> Die Bildung von Wasserstoffbrücken erweist sich in polaren Medien wie Wasser jedoch als schwierig, da die Donor- und Akzeptorstellen in Konkurrenz mit den Wassermolekülen stehen und solvatisiert vorliegen.<sup>[15–17]</sup> Bei Proteinen z. B. umgeht die Natur geschickt die Probleme, die für Guanidiniumgruppen in wässrigem Milieu auftreten können, durch die Ausbildung von hydrophoben Taschen, also einer veränderten Mikroumgebung, die die Bindung begünstigt.<sup>[8]</sup> Da *in vitro* die Interaktionspartner direkt mit der Umgebung (Wasser, polare Lösungsmittel) in Kontakt stehen, ist die Bildung von stabilen und starken Wechselwirkungen



basierend auf Wasserstoffbrücken herausfordernd. Die Studien von *Schmidtchen et al.* demonstrieren wie empfindlich die Guanidinium-Carboxylat-Komplexbildung auf das verwendete Lösungsmittel reagiert.<sup>[18]</sup> So konnten die Forscher bei der Untersuchung von Verbindung **2** (s. Abbildung 2) und Tetraethylammoniumacetat in Acetonitril noch eine Assoziationskonstante von  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  mittels ITC bestimmen, jedoch war die Wärmemenge in Methanol als Lösungsmittel schon zu gering, um erfasst werden zu können. Zudem zeigte das thermodynamische Profil, dass die Bindung sowohl einen günstigen enthalpischen als auch entropischen Einfluss aufwies. Dies deutet darauf hin, dass neben der elektrostatischen Interaktion auch eine günstige Freisetzung von Solvensmolekülen auf die Komplexbildung einwirkt. *Schmuck* entwickelte 1999 ein Oxo-Anionenbindungsmotiv (GCP), welches durch die Kombination von Guanidin und Pyrrol eine Carboxylatbindungsseite ausbildet, die auch in wässriger Umgebung ein Wasserstoffbrückennetzwerk aufbauen kann.<sup>[19,20]</sup> Einfache Guanidiniumkationen (**3**) sind in hoch kompetitiven Medien, wie Wasser, keine effektiven Carboxylatbinder. *N*-Acetylguanidin **4** weist in Lösungen von 40 % Wasser in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  schon eine Bindungskonstante von  $50 \text{ M}^{-1}$  auf.<sup>[20]</sup> Durch Einführung von elektronenziehenden Gruppen wird zusätzlich der  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert des Guanidins von 13.5 auf ca. 7 gesenkt, wobei sich generell der  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert monosubstituierter Guanidine der Reihe Alkyl < Phenyl < Acyl folgend verringert.<sup>[10]</sup> Wird **4** zusätzlich mit Pyrrol verknüpft (Ligand **5**) ist die Bindungsaffinität fast verdreifacht.<sup>[20]</sup> Pyrrol kann als starker Wasserstoffbrückendonator auch in polaren Lösungsmitteln Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und ist somit ein attraktiver Baustein für Anionenerkennungsmotive.<sup>[15,21]</sup> Ein weiterer erwähnenswerter Baustein ist Indol, dessen NH ein noch stärkerer Wasserstoffbrücken-Donor ist, bedingt durch eine etwas höhere Azidität. Der chelatisierende Ligand **6** weist Bindungskonstanten von  $110 \text{ M}^{-1}$  zu Acetat und  $360 \text{ M}^{-1}$  zu Phosphat in 5 % Wasser-DMSO auf. Spezifisch ist **6** jedoch für Fluoridionen, da sich das Anion durch eine induzierte Konformationsänderung optimal in die geformte Mulde einfügt.<sup>[22]</sup> Der Ligand **7** besteht aus zwei Indol-Einheiten, die über eine Harnstoffstruktur verlinkt sind. Er kann Phosphat in polaren Mischungen von 25 % Wasser in DMSO mit einer Bindungskonstanten von  $160 \text{ M}^{-1}$  binden.<sup>[23]</sup> Durch weitere Einführung von nicht-kovalenten Bindungseinheiten, vorzugsweise in einer präorganisierten, umklammernden Anordnung, erhöht sich also die Stabilität weiter, indem der Aufbau eines gerichteten Wasserstoffbrückennetzwerks ermöglicht wird. Ausgehend vom Ligand **5** wird durch Einführung einer zusätzlichen Amidfunktion am Pyrrolkern in 4-Position eine solche Klammer gebildet. Der resultierende Ligand **8** weist in 40 % Wasser in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  eine Bindungskonstante von  $770 \text{ M}^{-1}$  (NMR Titration) auf, die gegenüber dem nicht-substituierten Liganden **5** um das 6-fache erhöht ist.<sup>[20]</sup> *Kilburn et al.* entwickelten einen asymmetrischen Pyridin-Liganden (**9**), der mit Acylguanidin und einem Amid verknüpft ist.<sup>[24]</sup> Durch den Aufbau des Wasserstoffbrückennetzwerks entstand so ein Carboxylatbinder, welcher Acetat in 30 %  $\text{H}_2\text{O}$  in DMSO mit einer Bindungskonstanten von  $480 \text{ M}^{-1}$  (ITC) bindet.



**Abbildung 2.** Beispielhafte Auswahl von künstlichen Anionenbindungsmotiven. Blau hervorgehoben ist das Guanidiniumkation. Gelb hervorgehoben sind die ausgehend von Guanidin entworfenen Liganden von *Schmuck*, deren Entwicklung in maßgeschneiderten Liganden für vorgegebene, anionische Zielpeptide resultiert.

Pyridinliganden sind jedoch aufgrund der repulsiven Wechselwirkung zwischen dem freien Elektronenpaar des Pyridin-Stickstoffs und denen der Carboxylat-Sauerstoffe den pyrrolbasierten Liganden unterlegen.<sup>[25,26]</sup> Letztlich führt die Weiterentwicklung der pyrrolbasierten Guanidinliganden zu Verbindungen analog zu **10** (Abbildung 2), die sozusagen auf spezifische Zielmoleküle maßgeschneidert werden.

Das **Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP) (11)** weist durch den Aufbau eine Reihe von Eigenschaften auf, die Bindungsaffinitäten und –selektivitäten zu Oxoanionen vorteilhaft beeinflussen (Abbildung 3). GCP ist planar und formt eine relativ unflexible Carboxylatbindungsseite aus.<sup>[20]</sup> Die *N*-Acetylguanidineinheit weist eine erhöhte Azidität auf ( $pK_s$ -Wert  $\sim 6$ – $7$ <sup>[20,27]</sup>), wodurch die Bildung des Wasserstoffbrücken-unterstützenden Ionenpaares bevorzugt wird. Die Einführung zusätzlicher Wasserstoffbrücken-Donoren ermöglicht die Ausbildung eines Wasserstoffbrücken-Netzwerks. Das Amid-NH unterstützt als wichtigster, zusätzlicher Wasserstoffbrücken Donor die Bindung mit einem Energiebeitrag um  $4 \text{ kJmol}^{-1}$ .<sup>[20]</sup> Selektivität kann durch die Wahl der Seitenkettensequenz erreicht werden. In DMSO kann so für die GCP-Carboxylat-Wechselwirkung eine Bindungskonstante  $> 10^4 \text{ M}^{-1}$  erzielt werden und in wässrigen Medien beträgt die Assoziationskonstante  $K_A$  immer noch  $10^3 \text{ M}^{-1}$ .<sup>[28,29]</sup> Aufgrund der genannten Vorteile, wird GCP als Bindungsmotiv für Anionen in die

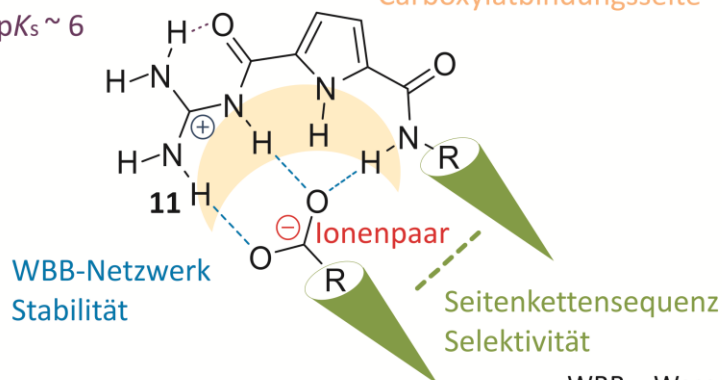
in dieser Arbeit verwendeten supramolekularen Liganden eingebaut. Dadurch sollen die Bindungseigenschaften der Liganden im Gegensatz zu Liganden mit der natürlichen Aminosäure Arginin verbessert werden.

WBB

erhöhte Azidität

$pK_s \sim 6$

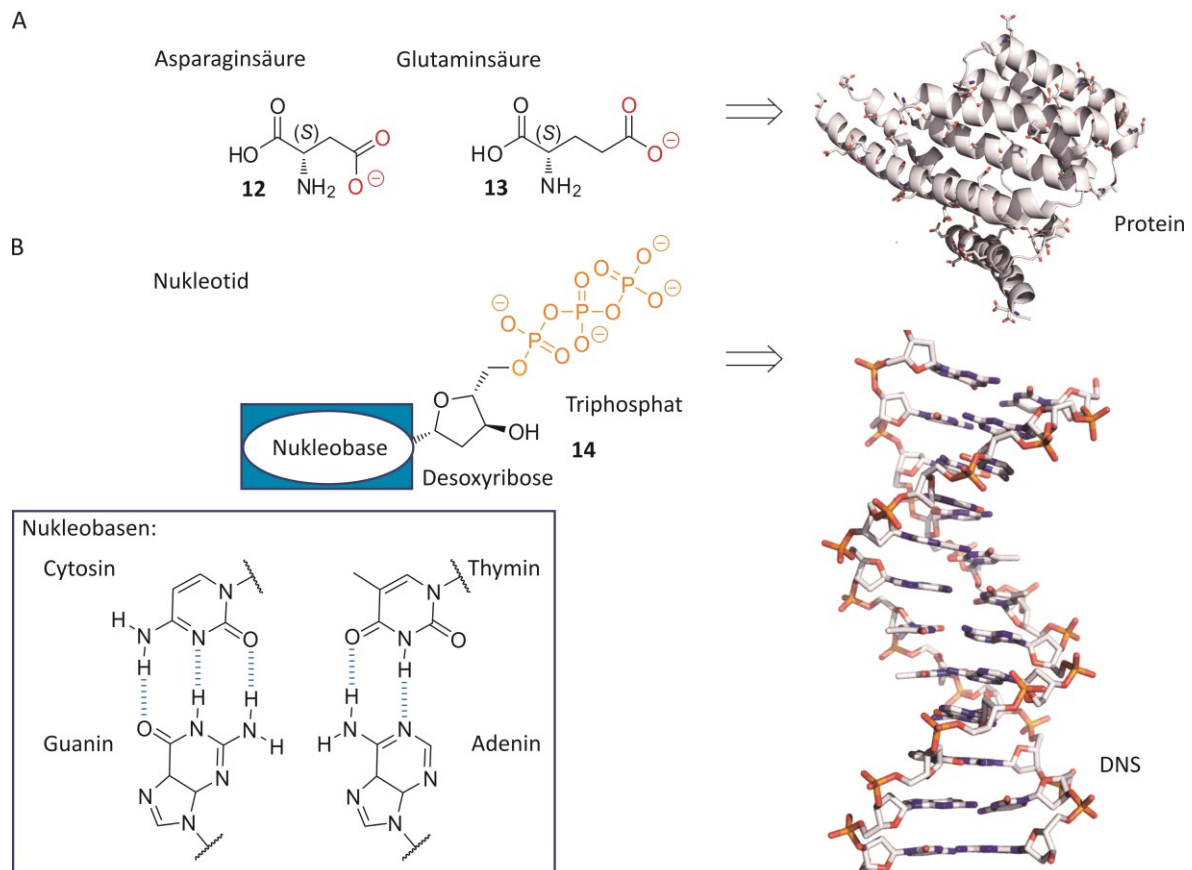
Carboxylatbindungsseite



WBB = Wasserstoffbrückenbindungen

**Abbildung 3.** Das GCP-Bindungsmotiv (**11**) bildet zusätzlich zu dem Ionenpaar ein Wasserstoffbrückennetzwerk aus und formt so eine Carboxylatbindungsseite, über die Carboxylate und andere Oxo-Anionen in wässrigen Lösungen effizient gebunden werden können.

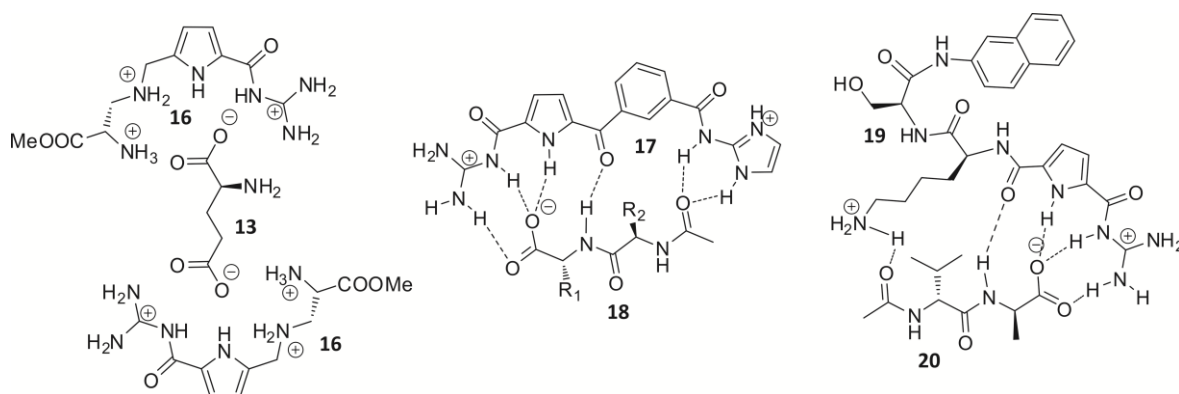
Die Erkennung von Carboxylaten und Phosphaten nimmt einen besonderen Stellenwert ein, aufgrund ihres Vorkommens in den natürlichen Aminosäuren wie und L-Asparaginsäure (Asp) (**12**) L-Glutaminsäure (Glu) (**13**), den Bausteinen der Proteine, und Nukleotiden (**14**), durch deren Verknüpfung DNS gebildet wird. Der auf GCP-basierende Ligand **16** kann sowohl mit Glutamin- als auch mit Asparaginsäure stabile Komplexe in Wasser/DMSO (9 : 1) ausbilden. Interessanterweise wurde für die Bindung von Glutamat ein 2 : 1 Komplex (Abbildung 5) und positiver kooperativer Effekt festgestellt mit  $K_{A1} = 460 \text{ M}^{-1}$  und  $K_{A2} = 3300 \text{ M}^{-1}$ . Mit Aspartat bildet **16** einen 1 : 1-Komplex mit einer Assoziationskonstanten von  $480 \text{ M}^{-1}$ , was auf ungünstige sterische und repulsive Wechselwirkungen durch die verkürzte Seitenkette von Aspartat erklärt wird.<sup>[28]</sup> Durch die Entwicklung von GCP-tragenden Liganden für die Erkennung der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure sowie für die Phosphatgruppen eröffnet sich die Möglichkeit komplexere Zielmoleküle zu adressieren. Dabei gelangt man ausgehend von den Aminosäuren über Di- und Polypeptiden zu Proteinen und von Phosphat über einzelne Nukleobasen hin zu DNS. Genau darauf steuern die in dieser Arbeit entwickelten, mit GCP-funktionalisierten Liganden hin – mit komplexen Biomolekülen zu interagieren. Aspartat, Glutamat und Phosphat stellen somit im Rahmen dieser Arbeit die grundlegenden Ziele für die molekulare Erkennung komplexer Proteine und DNS dar.



**Abbildung 4.** A) Die natürlichen Aminosäuren Asparaginsäure (**12**) und Glutaminsäure (**13**) sind wichtige Bestandteile von Proteinen und auf vielen Proteinoberflächen (Protein:14-3-3ζ-Monomer; pdb 4IHL)<sup>a</sup> zu finden. B) Nukleotide (**14**) kommen als Mono-, Di- und Triphosphate vor. Durch die Verknüpfung der Nukleotide bildet sich ein DNS-Strang, der sich durch komplementäre Basenpaarung zu einer doppel Helix (exemplarische Kristallstruktur einer B-Form Helix pdb 1BNA) windet.

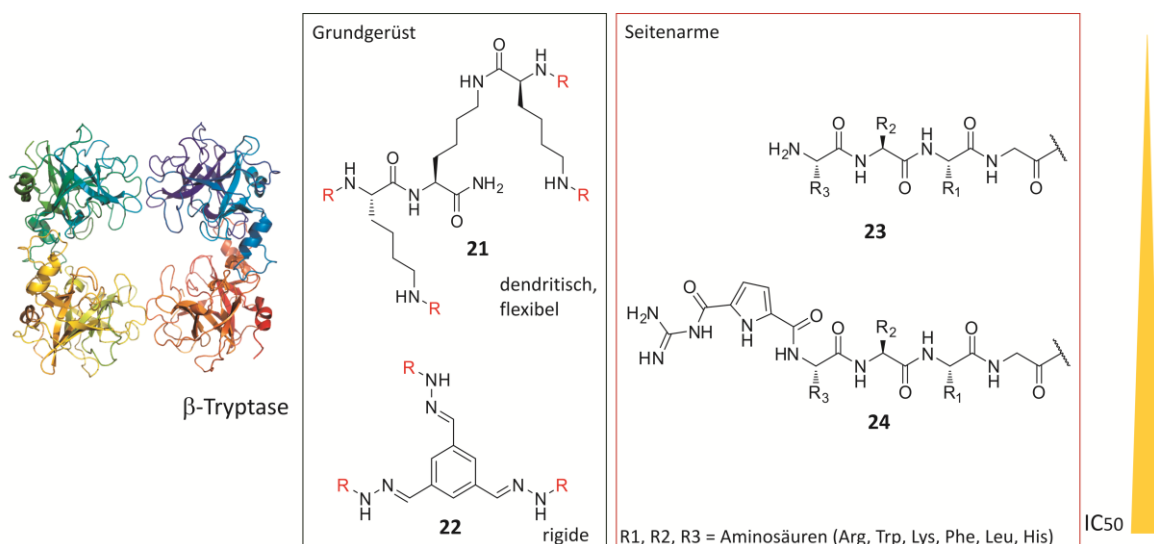
Bei der Untersuchung der Bindung von Dipeptiden durch Ligand **17** zeigte sich, dass die Bindungsaffinitäten zu den Dipeptiden um den Faktor 10 stärker sind verglichen mit den einzelnen Aminosäuren. Die erhöhte Stabilität wird auf die zusätzlichen Bindungsstellen, auch durch das Amid-Grundgerüst, zurückgeführt. Die höchste Affinität zeigte **17** für Valin–Valin ( $K_A = 54300 \text{ M}^{-1}$ ), dasjenige Dipeptid mit der höchsten Hydrophobizität und geringsten Flexibilität unter den getesteten Verbindungen. Dies verdeutlicht den Einfluss der Seitenkettensequenzen.<sup>[30]</sup> Für zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Dipeptiden wurde die dikationische Verbindung Lysin–GCP mit einer Naphthylgruppe (Ligand **19**) verknüpft. Allerdings deuteten molekülmechanische Rechnungen auf eine  $\pi$ – $\pi$ -Stapelung des Naphthylrings mit dem Pyrrolring hin. Trotzdem bindet der Ligand verschiedene Di- und Tripeptide [Ac–D–Val–D–Ala–OH (**20**)  $K_A = 4.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , Ac–D–Phe–L–Ala–OH  $K_A = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , Ac–L–Ala–L–Ala–L–Glu–OH  $K_A = 2.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  in 5 mM Bis-Tris-Puffer mit 20% DMSO bei pH 6] mit hohen Affinitäten.<sup>[31]</sup>

<sup>a</sup>pdb - Dateien sind auf der Proteindatenbank [www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) hinterlegt. Alle Abbildungen wurden mit PyMol ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) angefertigt.



**Abbildung 5.** Verschiedene Liganden, die einfache Aminosäuren und kleine Peptide binden können.

Wich *et al.* adressierte das tetramere Enzym  $\beta$ -Tryptase (Abbildung 6) mit vierarmigen Liganden, aufgebaut durch ein dendritisches Grundgerüst (**21**).<sup>[32]</sup> Der dendritische Aufbau ermöglicht eine einfache Einführung mehrerer Seitenarme. Daher wird dieses Grundgerüst auch für die multivalenten Liganden, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, verwendet. Durch das Screening einer kombinatorischen Bibliothek mit Variation der Seitenarmsequenz analog zu **23** konnte eine Verbindung mit vier identischen Aminosäure-Sequenzen, bestehend aus RWKG, gefunden werden, die einen  $IC_{50}$ -Wert von 170 nM aufwies. Dabei wurde postuliert, dass durch die Verbindung der Zugang zur Pore, in der sich die aktiven Zentren des Enzyms befinden, blockiert wird. Durch Verwendung von Seitensequenzen analog zu **24**, die also eine zusätzliche GCP-Einheit aufweisen, konnten vorerst keine effektiveren Inhibitoren im Vergleich zu den bis dahin untersuchten Inhibitoren gefunden werden.

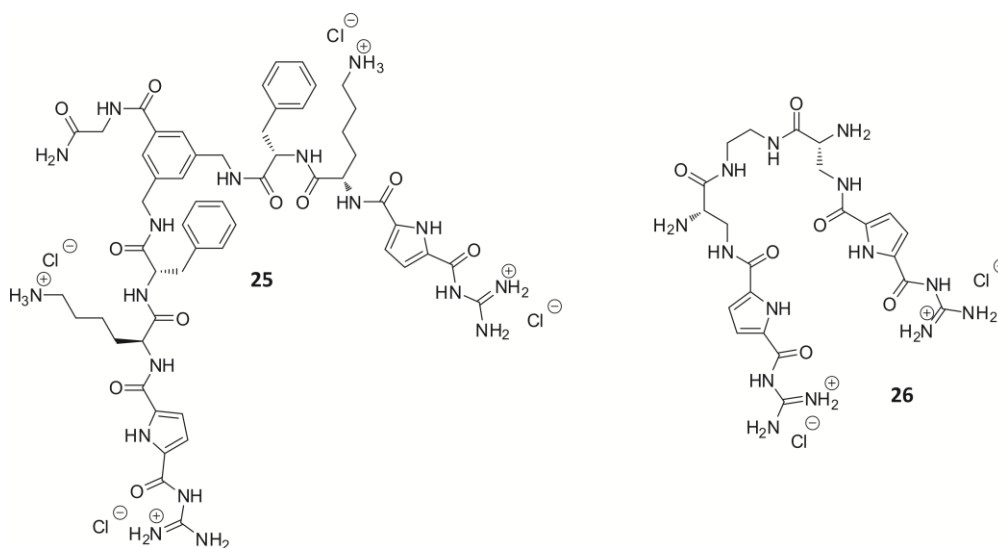


**Abbildung 6.** Inhibitoren der  $\beta$ -Tryptase (pdb 1A0L). Durch Variation des Grundgerüsts und der Seitenkettensequenz konnten die Inhibitoren weiter verbessert werden.

Docking-Studien deuteten auf zwei verschiedene Bindungsstellen für die peptidischen Liganden hin. Daher entwickelte Jiang *et al.* vierarmige Verbindungen ebenfalls basierend auf Grundgerüst **23** mit zwei verschiedenen Seitenarmsequenzen.<sup>[33]</sup> Der Inhibitor (RWKG)<sub>2</sub>(RLFG)<sub>2</sub> ( $K_i = 4 \mu M$ ) konnte verbessert werden, indem in einer Sequenz Arginin gegen GCP ausgetauscht wurde. So

konnte der potente Inhibitor  $(\text{RWKG})_2(\text{GCP-LFG})_2$  ( $K_i = 67 \text{ nM}$ ) identifiziert werden. Durch Veränderung des Grundgerüsts hin zu einem rigidem, dreiarmligen Benzolhydrazon (**22**) wurde mittels einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek der in dieser Studie effektivste Inhibitor **22**– $(\text{GKWR})_3$  mit  $K_i = 12.5 \text{ nM}$  gefunden.<sup>[34]</sup> Durch geschickte Kombination von Seitenarmsequenzen und –anzahl konnten die Inhibitoren der  $\beta$ -Tryptase weiter verbessert werden. Die Studien verdeutlichen zudem den Einfluss sowohl der Seitenkettensequenz als auch des Grundgerüsts auf die Bindungsereignisse. Die mehrarmigen Liganden können folglich für die Erkennung von Proteinoberflächen eingesetzt werden, um die Aktivität von Proteinen (hier das Enzym  $\beta$ -Tryptase) zu beeinflussen.

Kuchelmeister *et al.* untersuchte mittels eines zweiarmligen Liganden (**25**), dessen Seitenarme bestehend aus FK-GCP über einen aromatischen Kern verlinkt sind (Abbildung 7), die Erkennung verschiedener Nukleotide.<sup>[35]</sup> Dabei konnten mittels UV/Vis-Spektroskopie Bindungskonstanten von  $0.5\text{--}1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  in wässrigen  $0.02 \text{ M}$  Bis-Tris-Pufferlösungen mit  $\text{pH } 7$  bestimmt werden. Der Ligand weist zu Uridinmonophosphat (UMP), einen Bestandteil von RNS, die höchste Affinität auf. Die Bindungsstärke zu den Nukleotiden ist wie folgt gestaffelt:  $\text{UMP} > \text{GMP} \approx \text{AMP} > \text{ADP} > \text{ATP} \approx \text{Phosphat}$ . Zwei über einen Ethylendiamin-Linker verknüpfte GCP-Einheiten (Ligand **26**) wurden auf die Fähigkeit hin untersucht, größere Polynukleotide zu binden. Sowohl für dsDNS als auch RNS konnten Bindungskonstanten im mikromolaren Bereich (UV/Vis-Spektroskopie und ITC) gefunden werden. Mittels AFM wurde zusätzlich die DNS-Kondensation durch den Liganden beobachtet.<sup>[36]</sup>



**Abbildung 7.** Liganden zur Erkennung von Nukleotiden und Polynukleotiden

Diese Beispiele zeigen das Potential von rational entwickelten Liganden mit künstlichen Bindungsmotiven, wie dem GCP, auf. Die Liganden eignen sich dadurch für die Erkennung von komplexen Molekülstrukturen wie Proteinoberflächen oder für die Bindung von DNS. Im nächsten Abschnitt wird beschrieben, wie Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen genommen werden kann und warum das von Bedeutung ist.

## 2.2. Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die Verbesserung des im 17. Jahrhundert von *Leeuwenhoek* erfundenen Mikroskops und die Einführung der Lichtmikroskopie im 19. Jahrhundert erlaubten einen immer detailreicheren Einblick in das Innere von Zellen. Mit der von *Wolff*, *Purkinje*, von *Mohl* und *Schleiden* begründeten Zellenlehre wurde die Zelle als Grundelement aller Lebewesen erforscht. Zu den Makromolekülen einer Zelle gehören neben DNS, RNS, Lipiden und Kohlenhydraten auch **Proteine**.<sup>[37]</sup> Proteine stemmen die Aufgaben, die verrichtet werden müssen, damit eine Zelle funktioniert. Sie sind in einer jeden Zelle die Werkzeuge oder strukturell angepassten Roboter, die – jeder eine bestimmte Teilaufgabe erfüllend – im Zusammenspiel ein komplexes Ziel verfolgen: Leben. Die Informationsweitergabe oder die Vermittlung eines Effekts (u. a. Regulation, Aktivierung, Translokation) folgt dabei meist einer Kettenreaktion, der **Signalkaskade**. Dazu müssen die einzelnen Kettenglieder miteinander in Verbindung stehen, wenn denn auch nur kurzzeitig, wodurch sich ein kompliziertes Netzwerk aus **Protein-Protein-Interaktionen (PPI)** ergibt. Das humane Interaktom, die Gesamtheit all dieser molekularen Wechselwirkungen, umfasst geschätzte 650000<sup>[38,39]</sup> Kontakte bei einer Anzahl von ca. 20000<sup>[40,41]</sup> nichtmodifizierten Proteinen (modifiziert könnte der Wert sogar 100-fach höher liegen).<sup>[40,42–47]</sup> Die Wechselwirkung zwischen Trypsin und Antitrypsin wurde 1906 von *Hedin* beschrieben und zählt zu einer der ersten bekannten PPI.<sup>[47,48]</sup>

Proteine interagieren über Kontaktflächen, deren Größe zwischen 1500 und 3000 Å<sup>2</sup> liegt und deren Beschaffenheit eher strukturlos ist. Der Kontakt wird insbesondere durch eine Kombination aus hydrophoben und unterstützenden elektrostatischen Wechselwirkung vermittelt.<sup>[49–52]</sup> Permanente Wechselwirkungen weisen hohe Bindungsaffinitäten auf (nM-Bereich), dagegen zeichnen sich transiente Wechselwirkungen (µM-Bereich) durch ein schnelles Gleichgewicht zwischen dem assoziierten und dissoziierten Komplex aus.<sup>[53–55]</sup> Die Triebkraft für die Interaktion kann hauptsächlich auf den hydrophoben Effekt zurückgeführt werden.<sup>[56–58]</sup> Sogenannte *hot spots* liefern dabei den größten energetischen Beitrag. Die Verringerung der freien Energie kann allein durch die Vermittlung der *hot spots*  $\Delta\Delta G_{\text{Bindung}} > 1.5 \text{ kcalmol}^{-1}$  betragen.<sup>[59]</sup>

PPI sind an fast jedem biologischen Prozess beteiligt. Ihr Aufgabenbereich reicht von Signaltransduktion, Translokation, Zellwachstum, dem Einsatz als Strukturelement, über die Regulation des Stoffwechsels, bis hin zu DNS-Replikation und Translation.<sup>[60,61]</sup> Fehlfunktionen führen zum Zelltod oder im schlimmsten Fall zu Krebs. Jede einzelne Interaktion stellt ein mögliches Ziel für die Entwicklung neuer Pharmazeutika dar.<sup>[50,51,62–65]</sup> Als Alternative zu klassisch medizinisch-chemischen Wirkstoffzielen, wie Enzymen, Rezeptoren oder Membrantransportern, birgt die Untersuchung von PPI ein unerforschtes Potential Krankheiten zu adressieren, für die es bislang keine (geeignete) oder effektive Behandlungsmethode gibt.<sup>[60]</sup> Insbesondere, wenn man bedenkt, dass bisher nur ein geringer Teil – sozusagen die Spitze des Eisbergs – der ca. 650000 Wechselwirkungen zwischen den Proteinen bislang von Modulatoren beeinflusst wurde. Zudem steckt dieser Forschungsbereich noch in den Kinderschuhen. Erst 2004 brachten *Arkin* und *Wells* einen Aufsatz über niedermolekulare Inhibitoren von PPI „*Progressing towards the Dream*“



heraus,<sup>[50]</sup> 10 Jahre später wurde der Folgeartikel unter dem Namen „*Progressing towards the Reality*“ veröffentlicht.<sup>[66]</sup> Dies zeigt zudem die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der PPI-Forschung, was um 2000 noch Traum und Zukunftsforschung war, ist heute eine etablierte und angewandte Forschung mit realen Perspektiven. Auch die schon zahlreichen Verbindungen, die sich in klinischen Studien befinden (insbesondere für die Behandlung von verschiedenen Krebsarten oder Atherosklerose) und in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden, belegen das. Nachfolgend werden einige interessante PPI vorgestellt und wie sie erfolgreich moduliert werden. Des weiteren stehen Verbindungen im Vordergrund, die durch ihre Geschichte bekannt und beispielhaft sind.

### 2.2.1. Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Protein-Protein-Interaktionen können auf zweierlei Weise moduliert werden: Die Wechselwirkung kann durch einen **Disruptor** gestört<sup>[66–69]</sup> oder durch einen **Stabilisator** gestärkt<sup>[70–74]</sup> werden.<sup>[62,75–78]</sup> Verglichen mit der Anzahl von Disruptoren ist die Anzahl von bekannten Stabilisatoren gering. Dies ist mitunter darauf zurückzuführen, dass bei der Disruption prinzipiell nur mit einem der beiden wechselwirkenden Proteine interagiert werden muss. Bei der Stabilisierung sind je nach Angriffspunkt beide Proteine beteiligt. Angriffspunkt für Modulatoren von PPI können neben den Kontaktflächen bzw. den *hot spot*-Regionen, auch allosterische Stellen sein. Gerade die Kontaktflächen sind wichtige Regionen für die Entwicklung von Disruptoren, da hier der Ligand mit dem eigentlichen Interaktionspartner um die Bindungsstelle konkurriert. Die *hot spots* können z. B. auch durch die Seitenketten von Aminosäuren wie Glutamin- oder Asparaginsäure gebildet werden. Sie sind daher vielversprechende Zieleregionen bei den molekularen Erkennungsprozessen von Proteinoberflächen und somit von großem Wert für die Entwicklung von Modulatoren von PPI. Wie bereits in Abschnitt 2.1 beschrieben können GCP-tragende Liganden, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, besonders gut mit den Carboxylatresten der beiden Aminosäuren wechselwirken. Allosterische Modulation erfolgt nicht über die Grenzfläche, sondern durch Bindung des Modulators an anderer Stelle, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt.<sup>[59,76,79–81]</sup> Die meisten Moleküle, die sich in klinischen Studien befinden, sind PPI-Disruptoren und wirken über Konkurrenz zum Bindungspartner an der Bindungsstelle. Die Entwicklung der Modulatoren gilt als herausfordernd<sup>[50,79]</sup> und dementsprechend wird die Mehrzahl der Moleküle, meist **niedermolekulare Verbindungen**, weniger über **rationales** oder **fragmentbasiertes Design** sondern insbesondere über das **Screening größerer Substanzbibliotheken** gewonnen. Die dadurch identifizierten **Naturstoffe** werden dann unmodifiziert verwendet oder (mitunter aufwendig) derivatisiert.<sup>[79]</sup> Aber auch **peptidische Moleküle** werden als Leitstrukturen eingesetzt.<sup>[82]</sup> Vor diesem Hintergrund scheint es daher sinnvoll Modulatoren zukünftig eher rational zu entwickeln und nicht bloß zufällig welche zu finden. Daher steht auch im Rahmen dieser Arbeit das Design von synthetischen Liganden zur Modulation von PPI mit im Vordergrund.



Fehlfunktionen, die zu Krankheiten wie Krebs oder neurodegenerativen Störungen führen können, sind unter Berücksichtigung der hier beschriebene Thematik darauf zurückzuführen, dass

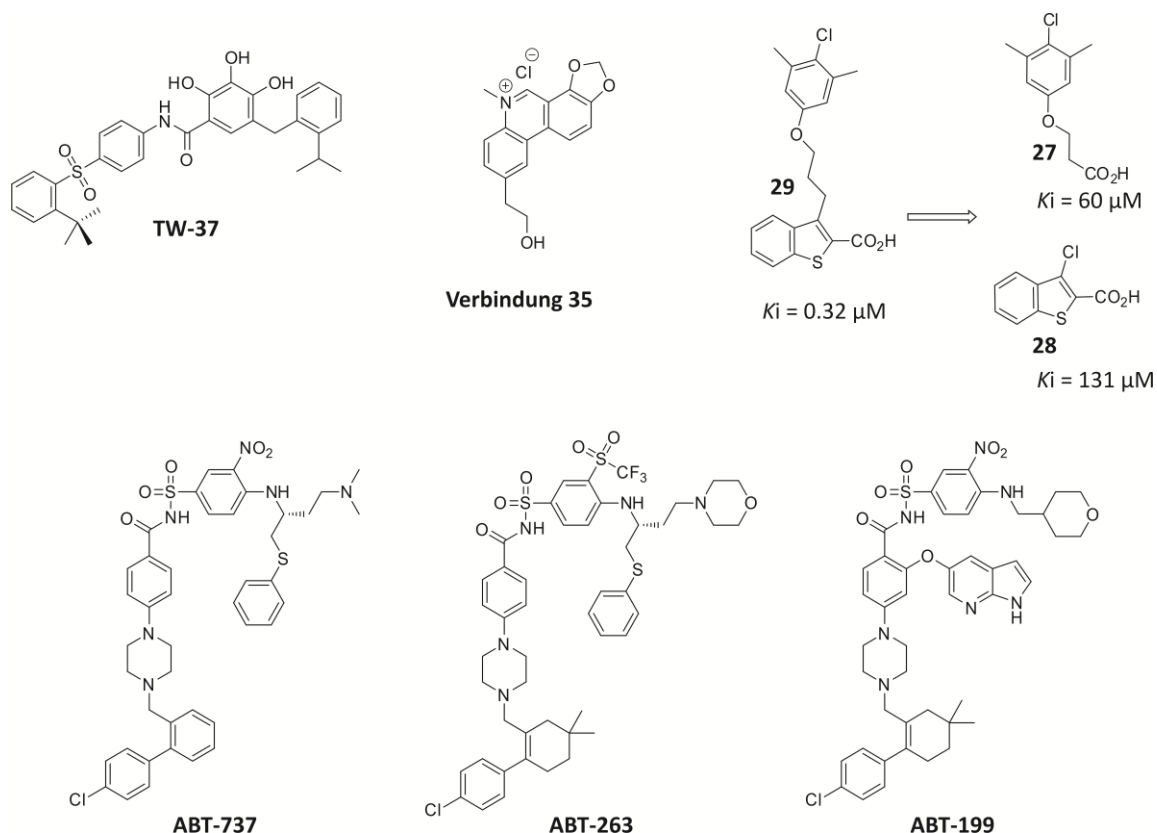
- a) entweder durch das Fehlen eines Bindungspartners oder Inhibition der Wechselwirkung durch fehlerhafte Selbstregulation eine PPI nicht stattfindet
- b) oder eine PPI zu einem falschen Zeitpunkt stattfindet oder unangebrachterweise stabilisiert wird

Diesen fehlerhaften Wechselwirkungen gilt es durch Disruptoren oder Stabilisatoren entgegenzuwirken.

#### 2.2.1.1. PPI-Disruptoren

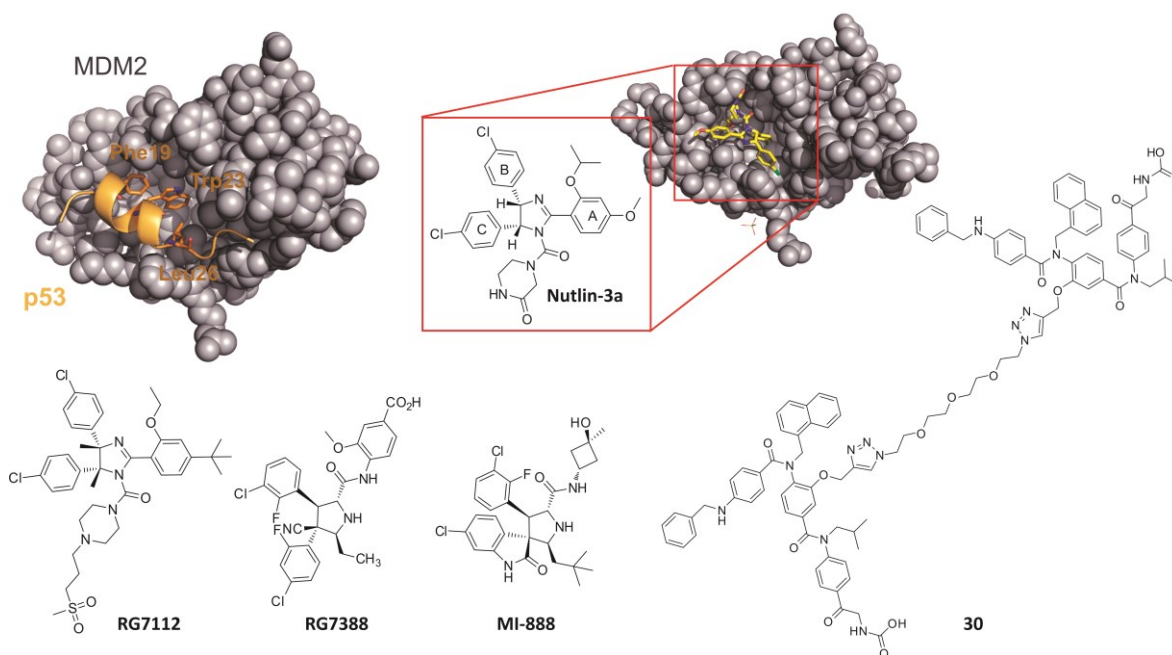
Der programmierte Zelltod, Apoptose, ist eine Schutzfunktion des Organismus. Zellen, die nicht mehr im Gefüge arbeiten, die alt sind, deren DNS beschädigt oder fehlerhaft ist, werden vom Organismus in den Tod geschickt. Eine charakteristische Eigenschaft von Krebszellen ist, den apoptotischen Signalweg zu blockieren und so „Unsterblichkeit“ zu erlangen. Proteine der *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-Familie* gehören zu den Hauptregulatoren der Apoptose. In der Zelle werden pro-apoptotische (Bak, Bad) Familienmitglieder durch Bindung an anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) Proteine inhibiert.<sup>[66]</sup> Vermittelt wird diese Bindung über eine spezielle einzelne Helix, der BH3-Domäne, der pro-apoptotischen Proteine. Durch die Blockade anti-apoptotischer Proteine kann die Signalkaskade wieder hergestellt werden und die Krebszellen werden in den Zelltod geführt. Dies macht die Bcl-2 Familie zu einem der bedeutensten Ziele der Antikrebsforschung.<sup>[83–86]</sup> Seit Anfang der 2000er Jahre publizierten einige Labors niedermolekulare **Disruptoren**, die an die Bak Bindungsstelle mit Affinitäten von 0.1–10  $\mu\text{M}$  binden können.<sup>[50,87–91]</sup> Beispielsweise konnten Wang *et al.* durch **strukturbasiertes Design** Inhibitoren von Bcl-2 finden,<sup>[89]</sup> unter denen die vielversprechendste Verbindung **TW-37** Bcl-2 mit einem  $K_i$ -Wert von 290 nM, bestimmt mittels Fluoreszenzpolarisations-Assay, binden kann. Es zeigte sich in weiterführenden Studien, dass TW-37 das Zellwachstum von Prostatakrebszellen mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 200 nM hemmen kann und zudem dosisabhängig die Apoptose einleitet. Chai *et al.* versuchten eine neue Verbindungsklasse zu finden,<sup>[90]</sup> indem sie sich zu Nutze machten, dass das Benzophenanthridin-Alkaloid Chelerythrin und das Isochinolin-Alkaloid Sanguinarin unterschiedlich an Bcl-XL binden, obwohl sie sich strukturell ähneln. **Abgeleitet von den natürlichen Strukturen** wurden Phenanthridinderivate entwickelt und in Fluoreszenzpolarisations-Assays gegen Bcl-XL getestet. Die enorme Synthesearbeit der Gruppe führte zu der Entdeckung von Verbindung **35**, die mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 3  $\mu\text{M}$  die Bcl-XL/Bak-Wechselwirkung inhibieren kann. Die Gruppe stellte in Aussicht ihre Inhibitoren durch Kombination und durch Entwicklung bidentater Verbindungen zu verbessern. Ein Beispiel für **Fragment-basiertes Design** stammt von Friberg *et al.*, die so einen potenten Inhibitor für die BH3-Mcl-1 Interaktion fanden.<sup>[92]</sup> Die Strukturen **27** und **28** alleine weisen  $K_i$ -Werte von 60 und 131  $\mu\text{M}$  auf; kombiniert man die Fragmente zu einer Verbindung (**29**), kann der  $K_i$ -Wert eindrucksvoll auf 0.32  $\mu\text{M}$  reduziert werden (Abbildung 8). Der erste duale Inhibitor von Bcl-2, **ABT-**

**737**, wurde 2005 von den *Abbott Laboratories* vorgestellt.<sup>[93]</sup> ABT-737 bindet die BH3-Domäne im subnanomolaren Bereich und kann so die Bindung zu Bax und Bak unterdrücken. 2009 befand es sich in klinischer Phase II-Studie, scheiterte aber letztlich daran, nicht oral bioverfügbar zu sein. Verbesserungen der oralen Bioverfügbarkeit führte zu **ABT-263**, Navitoclax, das in klinischer Phase I und II in den Studien zu soliden Tumoren und chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) erfolgreich getestet wurde. Allerdings konnte gleichzeitig eine Thrombozytopenie und eine damit einhergehende verstärkte Blutungsneigung festgestellt werden.<sup>[94–96]</sup> Die Weiterentwicklung führte zu **ABT-199**.<sup>[97]</sup> Dieses bindet Bcl-2 mit einer 10-fach höheren Affinität als ABT-263 und ist zudem selektiv für Bcl-2 (5 000-fach gegenüber Bcl-XL). Der Eintritt von ABT-199 in die klinische Phase Ia erfolgte 2011 und die Zulassung nur fünf Jahre darauf. Anfang 2016 wurde ABT-199 in den USA unter dem Handelsnamen Venclexta® (auch Venetoclax) für Patienten mit CLL als erster Bcl-2-Hemmer von der FDA (*Food and Drug Administration*, amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel) vorläufig zugelassen. Beschränkung: die Patienten müssen noch eine p17-Deletion aufweisen und vorab anderweitig behandelt worden sein. Bei der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) ist das Zulassungsgesuch eingereicht und andere potentiell zu behandelnde Krebsarten befinden sich in Studie.<sup>[97–99]</sup> Hier wird in Anbetracht des kurzen Zeitintervalls zwischen Erforschung und Zulassung besonders deutlich, wie dringend neue Verbindungen zur Bekämpfung von Krebserkrankungen benötigt werden.



**Abbildung 8.** Disruptoren für Wechselwirkung der Proteine der Bcl-2-Familie.

Ein weiteres vielbeforschtes Ziel ist die **p53/MDM2**-Wechselwirkung.<sup>[100,101]</sup> p53 ist ein Tumorsuppressor, der das Zellverhalten bei Stress (onkogene Aktivierung, DNS-Schädigung<sup>[102,103]</sup>, Hypoxie<sup>[104]</sup>, Telomerenerektion<sup>[105]</sup>) reguliert und so DNS-Reparaturmechanismen oder Alterungsprozesse auslöst, die die Zelle in den Zellzyklusarrest oder gar in die Apoptose schickt.<sup>[106]</sup> Reguliert wird p53 selbst durch MDM2 (*murine double minute 2*). MDM2 ist eine Ubiquitin-E3-Ligase, die p53 auf zweierlei Weise durch Interaktion inhibieren kann. Entweder bindet MDM2 an die transkriptionale Aktivierungsdomäne von p53, wodurch die Expressierung von p53-Zielgenen inhibiert wird, oder MDM2 bildet einen Proteinkomplex, der den nuklearen Export von p53 mediert, wodurch p53 sofort von Proteasomen im Zytoplasma abgebaut wird. Vermittelt wird diese Wechselwirkung durch die *hot spot*-Region um die Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26 von p53 (pdb-Datei 1YCR).<sup>[107,108]</sup> Bei Tumorkranken mit p53-Fehlfunktion weist entweder das humane Gen, das p53 kodiert, Mutationen auf, die die p53-Signalkaskade gestört oder p53 wird fehlreguliert, z. B. durch Überexpression von MDM2.<sup>[101]</sup> In vielen Fällen kann die p53-Inaktivierung mit der vermehrten Bindung von MDM2 in Verbindung gebracht werden. Würde die Wechselwirkung zwischen p53 und MDM2 gestört werden, könnte p53 wieder aktiv werden und so scheint die Suche nach MDM2-bindenden Molekülen vielversprechend.<sup>[109–115]</sup> Roche fand 2004 im Rahmen eines Hochdurchsatzscreenings **Nutline** als Disruptoren der MDM2/p53-Wechselwirkung (Abbildung 9).<sup>[116,117]</sup> Nutlin-3a wurde danach die Modellverbindung, wenn es darum ging die Interaktion zu erforschen. Die Kristallstruktur von Nutlin-3a und MDM2 (pdb 4J3E) zeigt, dass die Ringe B und C (beides Chlorphenylgruppen) die Leu26- und Trp23-Bindungstaschen ausfüllen, während Ring A in die Phe19 Tasche hereinreicht. Bei der Weiterentwicklung der Verbindung wurde auf diese Tatsache Rücksicht genommen und diese Strukturelemente blieben (kaum) unverändert.



**Abbildung 9.** Inhibitoren der MDM2/p53-Wechselwirkung. MDM2 im Komplex mit p53 (pdb 1YCR)<sup>[108]</sup>, Nutlin-3a bindet an MDM2 (pdb 4J3E).<sup>[118]</sup>

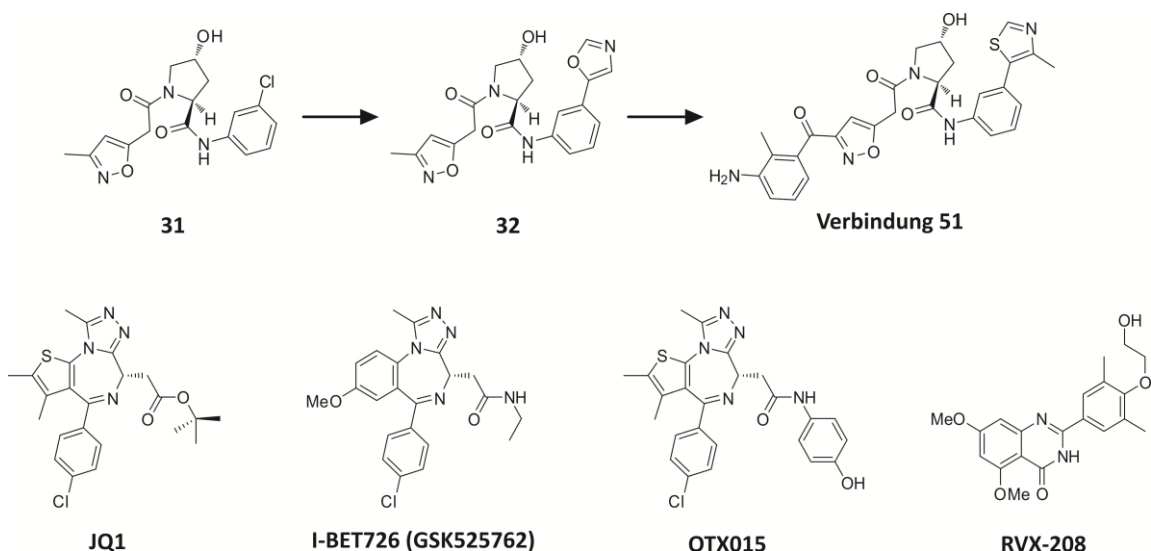
**RG7112**<sup>[118–122]</sup> wurde 2013 vorgestellt und leitet sich ebenfalls von Nutlin-3a ab. Die Veränderungen zielen darauf ab, die Verbindung stabiler in Bezug auf Oxidation (Methylierung des Imidazolinkerns) und Metabolismus (4-Methoxy-Funktion an Ring A) zu machen. Die Kristallstruktur (pdb 4IPF) zeigt, dass RG7112 fast deckungsgleich mit Nutlin-3a an MDM2 bindet. In einem *homogeneous time-resolved fluorescence* assay (HTRF) weist RG7112 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 18 nM auf (zum Vergleich Nutlin-3a IC<sub>50</sub> = 88 nM) und wurde als erste Verbindung für klinische Studien ausgewählt. Phase I wurde jedoch noch nicht erfolgreich abgeschlossen.<sup>[119,121]</sup> Das Augenmerk liegt nun bei dem Pyrrolidinderivat **RG7388**, das ebenfalls schon 2013 vorgestellt wurde und im HTRF-Assay einen IC<sub>50</sub>-Wert von 6 nM aufwies.<sup>[123]</sup> Studien mit RG7388 zeigen, dass es erfolgreich das Tumorstadium bei Neuroblastoma reduzieren kann, indem p53-vermittelt die Apoptose eingeleitet wird.<sup>[124]</sup> Ding *et al.* entdeckten 2006 Spiro-oxindole als neue Klasse für die Inhibition von MDM2.<sup>[125]</sup> Ausgehend von diesen Verbindungen präsentierten Zhao *et al.* im Jahr 2013 **MI-888** als effektivsten MDM2-Inhibitor.<sup>[126]</sup> MI-888 weist sowohl herausragende oral-pharmakokinetische Eigenschaften auf als auch die Fähigkeit in zwei Xenograft Modellen, bei denen humanes Tumorgewebe Mäusen transplantiert wurde, die Tumore komplett und dauerhaft zu vermindern. Eine weitere Möglichkeit p53 indirekt zu aktivieren kann darüber erfolgen, dass ein MDM2-Homodimer gebildet wird und MDM2 somit nicht mehr mit p53 wechselwirken kann. **RO2443** stabilisiert solch ein Homodimer (pdb 3U15).<sup>[127]</sup> Der erste **multivalente Disruptor** der p53/hDM2-Wechselwirkung wurde 2015 von Wilson *et al.* vorgestellt.<sup>[128]</sup> Die Bindung eines mono- und eines divalenten Helixmimetikums an die p53-Bindungsstelle von hDM2 wurde mittels FP, PAGE und Ultrazentrifugation miteinander verglichen. Dabei konnte der Nachweis erbracht werden, dass der divalente Ligand **30** doppelt so effektiv die Wechselwirkung inhibieren kann und dabei zugleich an zwei hDM2 bindet, also eine Dimerisierung induziert.

Ein anderes **Dimer**, das vorgestellt werden soll, ist ebenfalls Ziel von PPI-Disruptoren. Das Enzym **HIV-1 Protease** ist essentiell für den Lebenszyklus des humanen HI-Virus Typ1. Sowohl katalytische Stelle als auch Substratbindungsstelle werden nur während der Dimerisierung ausgebildet. Bisherige Medikamente steuern traditionell das aktive Zentrum des Enzyms an, HIV Infektionen können aber aufgrund der rapiden Weiterentwicklung und Mutationen des Virus noch nicht erfolgreich behandelt werden. Die Dimerisierungsgrenzfläche stellt dagegen einen hochkonservierten Bereich dar.<sup>[129–131]</sup> Poorman *et al.*<sup>[132]</sup> konnten ausgehend vom C-Terminus der HIV-1 Protease ein **Tetrapeptid**, Ac-Thr-Leu-Asn-Phe-COOH, ableiten, das das Enzym durch einen dissoziativen Mechanismus hemmen kann.<sup>[132,133]</sup>

Ein Beispiel für eine erfolgreiche **Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Analyse** ist die Weiterentwicklung der von Ciulli *et al.* vorgestellten peptidomimetischen Inhibitoren der **VHL/HIF-1 $\alpha$**  Wechselwirkung (Abbildung 11).<sup>[134]</sup> Die intrazelluläre Konzentration von HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor 1 $\alpha$* ) wird unter normalen Bedingungen gering gehalten, indem der Transkriptionsfaktor durch VHL ubiquitiniert wird. Bei chronischen Nierenleiden z. B. kann es zu einem anämischen Zustand kommen, durch den eine Hypoxie ausgelöst wird. Im Falle einer solchen

Hypoxie wird HIF-1 $\alpha$  aktiv und leitet Maßnahmen ein, die der Zelle helfen, sich der Sauerstoffunterversorgung anzupassen. Für die Wechselwirkung von HIF-1 $\alpha$  und VHL konnte als kleinste Untereinheit Hydroxy-Prolin identifiziert werden, das als Basis für die Disruptoren von *Ciulli et al.* dienen sollte. Der erste Inhibitor (**31**) wies einen moderaten IC<sub>50</sub>-Wert von 117  $\mu$ M auf und konnte die Analyse von Kristallstrukturen und sukzessiven Testen von Seitenresten so modifiziert werden, dass das Inhibitionsvermögen erst auf IC<sub>50</sub> = 4.1  $\mu$ M (**32**) und weiter auf 0.9  $\mu$ M (**Verbindung 51**) gesteigert werden konnte.<sup>[135–137]</sup>

Die **BET-Familie** Bromo-Domänen enthaltender Proteine (BET BRD) reguliert die Expressierung von Genen, die z. B. bei Entzündungsreaktionen wichtig sind. So zeigen BET-Inhibitoren antiproliferative und antiinflammatorische Effekte in onkologischen und inflammatorischen Modellen.<sup>[138–140]</sup> **Bromo-Domänen** steuern die Transkription von Genen, indem sie acetylierte Lysine (Kac) auf Histonen „lesen“ können und dadurch die Transkription initiieren.<sup>[141]</sup> Die Bromo-Domänen weisen dabei eine Affinität von ca. 100  $\mu$ M zu diesen Kac-Histon-Peptiden auf. Ein aktueller Artikel zur Struktur und den Aufbau von Bromo-Domänen wurde von *McKenna et al.* herausgebracht.<sup>[142]</sup> Schnell fanden sich synthetische Kac-Mimetika, die höhere Affinitäten aufwiesen. **JQ1** war eine der ersten Verbindungen, die veröffentlicht wurden, und diente vielen Forschergruppen als Leitstruktur.<sup>[143,144]</sup> In diesem Zusammenhang sind die Wechselwirkungen von BET BRD2-4 und Kac interessante Ziele, dementsprechend befanden sich schon 2013 fünf Verbindungen in klinischen Studien.<sup>[66]</sup> **I-BET762** (auch GSK525762)<sup>[145–147]</sup> von *Glaxo Smith Klein*, **CPI-0610**<sup>[148]</sup> von *Constellation*, **Ten-010**, jetzt RO6146, von *Tensha/Roche*<sup>[149]</sup> und **OTX15**, jetzt MK-8628,<sup>[150,151]</sup> von *OncEthix/Merck/Mitsubishi Tanabe* basieren auf dem JQ1-Grundgerüst und **RVX-208** ist ein Quinazolinon, das in die klinische Phase II für Artherosklerose aufgenommen wurde.<sup>[152–154]</sup> 2016 waren es schon fast doppelt so viele Verbindungen, die sich in klinischer Phase I oder II befanden, unter anderem **BMS-986158** von *Bristol-Myers Squibb*, INCB54329<sup>[155]</sup> von *Incyte Pharmaceuticals*, **ABBV-075**<sup>[156]</sup> von *AbbVie*, **FT-1101**<sup>[157]</sup> von *FORMA Therapeutics/Celgene*, und **PLX51107** von *Daiichi Sankyo*.<sup>[158]</sup> Die hier aufgelisteten Verbindungen lassen sich ebenfalls über das Portal *clinicaltrials.gov* finden. Eine Auswahl wird in Abbildung 10 dargestellt.



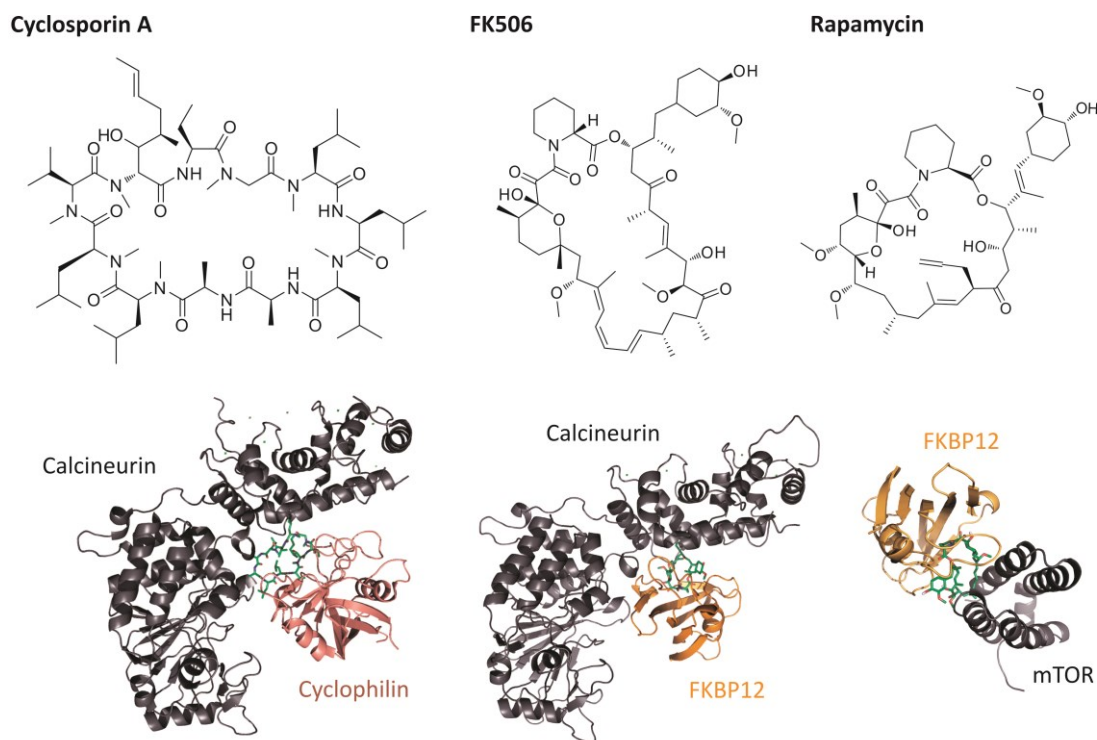
**Abbildung 10.** Weiterentwicklung der VHL/HIF-1 $\alpha$  Disruptoren (oben) und Auswahl von Inhibitoren der BET BRD (unten).

#### 2.2.1.2. PPI-Stabilisatoren

Eines der prominentesten Beispiele für einen **PPI-Stabilisator** ist das als Sandimmune® bekannte, immunsuppressiv wirkende **Cyclosporin A**.<sup>[159]</sup> Sandimmune® und andere galenisch weiterentwickelte Verbindungen wie Neoral® werden bei Organtransplantationen angewendet, um die Abstoßung der transplantierten Gewebe zu vermeiden. Entdeckt wurde es 1970 im Rahmen eines großen, allgemeinen Screening-Programms zur Auffindung von neuen Leitstrukturen für die Wirkstoffentwicklung unter der Leitung von *Sandoz*. Hunderte von Proben, die aus aller Welt zusammengetragen wurden, wurden dabei in unterschiedlichsten pharmakologischen Tests auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Probe 24-556 stammte aus einer norwegischen Bodenprobe und wurde aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen. Es zeigte bis auf immunsuppressive Wirkung keine weiteren positiven Resultate bei den Tests. Auch stellte sich schnell heraus, dass der Effekt nicht bloß auf unspezifische antiproliferative Aktivitäten zurückzuführen war. Der Hauptbestandteil dieser Probe war Cyclosporin A, das nur sechs Jahre später (1976) bereits innerhalb klinischer Studien getestet wurde.<sup>[160]</sup> Ab 1978 wurde Sandimmune dann bei Patienten zur Vorbeugung von Transplantatabstoßung nach Organtransplantationen und der *graft-versus-host*-Krankheit nach Knochenmarkstransplantationen angewendet. Seit 1983 ist es von der FDA, der amerikanischen Zulassungsbehörde für Lebensmittel und Medikamente, approbiert.<sup>[159]</sup> Strukturell weist das cyclische Undecapeptid Cyclosporin A (CsA) einige Besonderheiten auf, darunter D-Alanin und andere untypische Aminosäuren sowie N-methylierte Peptidbindungen. Das Zielmolekül von CsA ist Cyclophilin A in Komplexierung mit Calcineurin, wodurch ein ternärer Komplex aus Calcineurin–Cyclophilin A–CsA (pdb 1M63,<sup>[161]</sup> Abbildung 11) gebildet wird und die Enzymaktivität von Calcineurin durch Blockade der aktiven Zentren herabgesetzt wird. Calcineurin ist eine Phosphatase, die eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten einnimmt.<sup>[162–164]</sup> **FK506** ist ein



weiterer immunsuppressiver Wirkstoff, der im Zusammenhang mit Cyclophilin A steht. Die 1984 von *Fujisawa Pharmaceuticals* identifizierte und zu den Ascomycin-Macroliden zählende Verbindung ist oral verabreichbar und hat als primäres Ziel FKBP, welche mit Cyclophilin A wechselwirkt (pdb 1TCO).<sup>[165]</sup> Die Enzymaktivität von Cyclophilin A wird ebenfalls durch die Komplexbildung unterdrückt.<sup>[166–168]</sup>

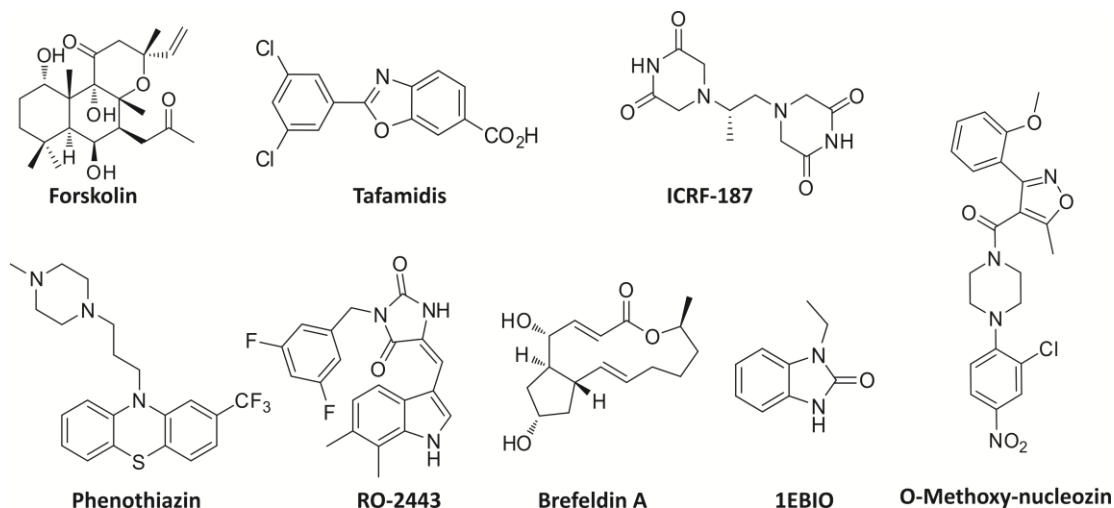


**Abbildung 11.** Die PPI-Stabilisatoren Cyclosporin A im Komplex mit Calcineurin und Cyclophilin (pdb 1M63),<sup>[161]</sup> FK506 im Komplex mit Calcineurin und FKBP12 (pdb 1TCO)<sup>[165]</sup> und Rapamycin im Komplex mit FKBP12 und mTOR (pdb 1FAP).<sup>[169]</sup>

Die dritte immunsuppressiv wirkende Verbindung ist **Rapamycin**, benannt nach *Rapa Nui*, den Osterinseln, auf denen die wirkstoffenthaltene Bodenprobe 1975 gewonnen wurde.<sup>[170,171]</sup> Calcineurin bindet analog zu FK506 an FKBP.<sup>[170]</sup> Der zweite Bindungspartner ist die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*).<sup>[172,173]</sup> Bindungskonstanten für die Wechselwirkung von Rapamycin an die Rapamycinbindungsdomäne von mTOR (FRB) wurden in An- und Abwesenheit von FKBP mittels FP, SPR und NMR ermittelt, wobei sich herausstellte, dass ohne FKBP die Bindung von Rapamycin an FRB moderate 26  $\mu\text{M}$  betragen, aber um das 2000-fache in Anwesenheit von FKBP gesteigert werden konnte.<sup>[170]</sup> 1999 wurde es unter dem Namen Rapamune® von *Pfizer* eingeführt.<sup>[75]</sup>

Das blutdrucksenkende **Forskolin** wurde 1977 von Mitarbeitern der Firma *Hoechst* aus der Wurzel der indischen Buntnessel *Coleus forskohlii* extrahiert.<sup>[174]</sup> Es ist viel kleiner als die vorstehend beschriebenen Makrozyklen und gehört zur Klasse der Labdane (Abbildung 12). Das bizyklische Diterpen ist zusätzlich mit einem Pyran-Rest verknüpft und stellte lange die Herausforderung, nicht besonders gut wasserlöslich zu sein. Allerdings ist die geringe Hydrophilie von Forskolin für die

Stabilisierung von Vorteil, da die Bindungsstelle hydrophob ist. Die kardiovaskulären und blutdrucksenkenden Eigenschaften von Forskolin beruhen auf der Stabilisierung der C1- und C2-Untereinheiten des transmembranen Enzyms Adenyl-Cyclase (pdb 1AB8).<sup>[175,176]</sup> Diese weist dadurch eine gesteigerte Aktivität auf, da das aktive Zentrum des Enzyms ebenfalls durch die Untereinheiten gebildet wird. Dies hat zur Folge, dass die zelluläre Konzentration des *second messenger* Moleküls mAMP erhöht wird.<sup>[177,178]</sup>



**Abbildung 12.** Auswahl einiger niedermolekularer PPI Stabilisatoren

**Brefeldin A** stabilisiert die Wechselwirkung des G-proteins ARF1 mit seinem Guanin-Austausch-Faktor (GEF) und wird für die Untersuchung des Membrantransports verwendet.<sup>[179–181]</sup>

**Tafamidis** [2-(3,5-Dichloro-phenyl)-benzoxazol-6-carboxylsäure] wurde 2011 unter dem Namen Vyndaqel® von *Pfizer* zur Behandlung der tödlich verlaufenden, neurodegenerativen Erkrankung Familiäre-Amyloid-Polyneuropathie vom Transthyretin-Typ (TTR-FAP) eingeführt. Als ein selektiver Stabilisator der dimeren Form von Transthyretin (TTR) kann es die neurologischen Störungen der TTR-FAP Patienten verzögern, indem es an die TTR-Bindungsstelle für das Hormon Thyroxin in nicht-kooperativer Weise bindet (pdb 3TCT). Bedingt durch eine Mutation oder Alterung kann das Tetramer instabil werden und TTR monomerisieren. Diese Monomere können Amyloidfibrillen bilden, die sich in verschiedenen Organen, u. a. Nerven, Herz und Nieren, ablagern können. Weltweit sind ca. 8000 Menschen betroffen.<sup>[182,183]</sup> **1EBIO** ist wohl einer der kleinsten Stabilisatoren, dafür weist er nur geringes Potential als Stabilisator auf und lässt an Selektivität missen. Das eher einfache Benzoimidazol 1EBIO stabilisiert die Wechselwirkung von Calmodulin mit dem Kaliumionenkanal.<sup>[184]</sup> **RO-2443** ist ein Stabilisator des MDMX-Homodimers, wodurch MDMX nicht mehr mit p53 wechselwirken kann und so die Aktivität des Tumorsuppressors p53 erhöht wird. Die Stabilisierung des Homodimers ist somit eine weitere Möglichkeit, die MDMX/p53-Wechselwirkung zu inhibieren. In Tabelle 1 ist eine Auswahl weiterer Stabilisatoren aufgelistet, auf die nicht im einzelnen eingegangen wird.<sup>[73]</sup>



**Tabelle 1.** Auswahl einiger PPI-Stabilisatoren<sup>[73]</sup>

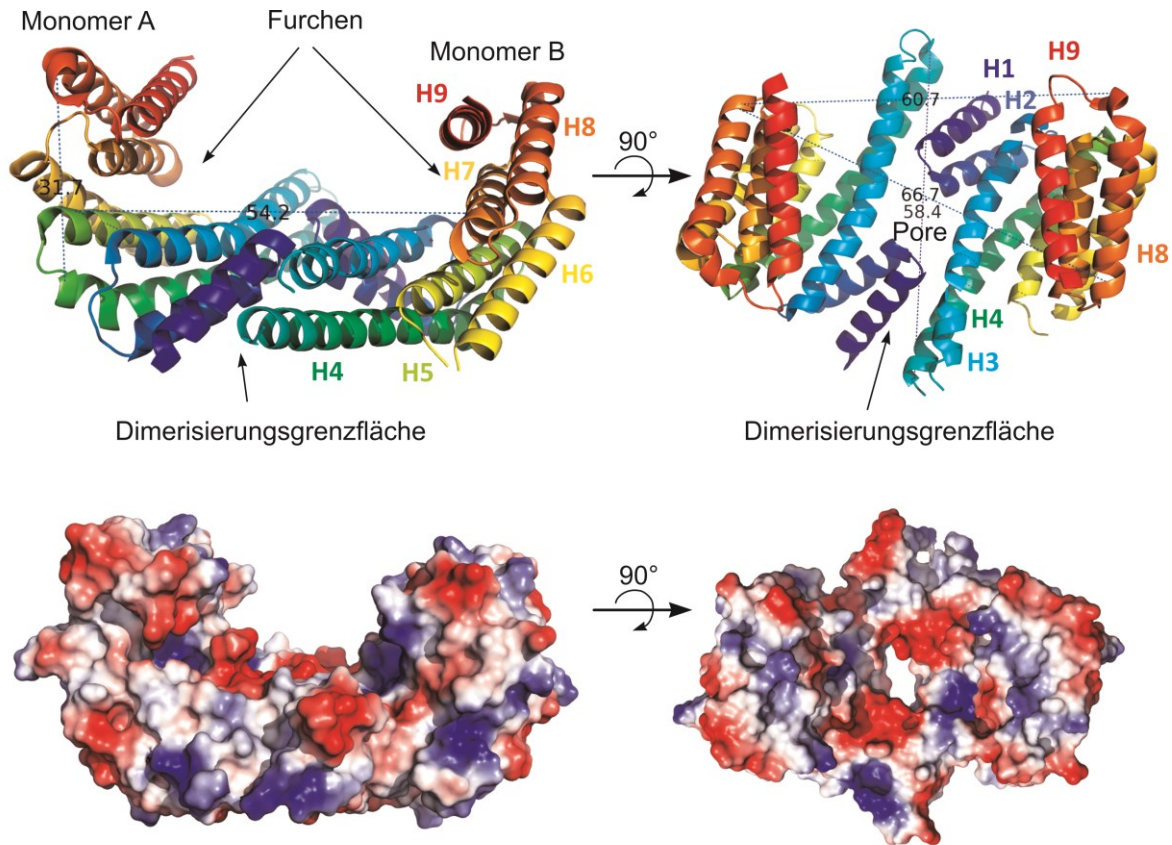
Stabilisator	Zielkomplex	Pdb-Code	Aktivität	Assay
<b>Cyclosporin A</b> <sup>[161,185]</sup>	Cyclophilin A/Calcineurin	1M63	CS-A an Cyclophilin $K_D$ $2 \times 10^{-7}$ M	Fluoreszenzassay
<b>FK506</b> <sup>[165,186]</sup>	Calcineurin/FKBP	1TCO	FK506 an FKBP $K_D$ 0.4 nM	kompetitive Bindung
<b>Rapamycin</b> <sup>[170]</sup>	FKBP/mTOR-FRB	1FAP	FRB $EC_{50}$ 490 nM Rapamycin $K_D$ 6 nM	FP
<b>Forskolin</b> <sup>[178]</sup>	C1/C2-UntereinheitenAdenylyl-Cyclase	1AB8	AC-Isoform abhängig; in Anwesenheit von 300 $\mu$ M FS	AC Aktivitätsassay
<b>Brefeldin A</b> <sup>[181]</sup>	ARF/GEF	1R8Q	$K_i$ 15 $\mu$ M	FP
<b>Auxin</b> <sup>[187]</sup>	TIR1/Auxin-IAA	2P1Q	$K_i$ 84 nM	kompetitive Bindung
<b>Jasmonat</b> <sup>[188,189]</sup>	Col1/JAZ6	3OGL	$K_i$ 1.8 $\mu$ M	kompetitive Bindung
<b>1EBIO</b> <sup>[184,190]</sup>	Calmodulin/CaMBD	4G28	$EC_{50}$ 295 $\mu$ M	Electrophysiologie
<b>O-Methoxy-nucleozin</b> <sup>[191]</sup>	Nucleoprotein-Dimer	3RO5	$IC_{50}$ 170 nM	Polymerase Assay
<b>Tafamidis</b> <sup>[192,193]</sup>	TTR-Homodimer	3TCT	$K_{D1}$ 3 nM, $K_{D2}$ 278 nM	ITC
<b>RO-2443</b> <sup>[127]</sup>	MDMX-Homodimer	3VBG	$IC_{50}$ 24 nM	MDMX/p53 Bindungsassay
<b>ICRF-187</b> <sup>[194,195]</sup>	Topoisomerase II-Homodimer	1QZR	$IC_{50}$ 13 $\mu$ M	Inhibitionsassay
<b>Phenothiazine</b> <sup>[196,197]</sup>	S100A4-Dimer	3KO0	$EC_{50}$ 55 $\mu$ M	Verdrängungsassay

Für diese Arbeit wurden die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF sowie zwischen 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein als Gegenstand der Untersuchung der Beeinflussung von PPI durch künstliche, multivalente Liganden ausgewählt. Aus diesem Grund widmet sich das nachfolgende Kapitel den 14-3-3-Proteinen und seinen Wechselwirkungen, die durch verschiedene Modulatoren beeinflusst werden können.

## 2.2.2. 14-3-3-Proteine

14-3-3-Proteine wurden bereits Ende der 1960er Jahren entdeckt, aber erst ab den 1990ern intensiv erforscht. *Moore* und *Perez* extrahierten die Proteinfamilie erstmals 1967 aus Säugetiergehirnen.<sup>[198]</sup> Sie erhielt die Proteine als vierzehnte Fraktion einer DEAE-Zellulose Auftrennung und einer anschließenden 2D-Stärke-Gelelektrophorese (Spot 3.3). In Säugetieren konnten bislang **sieben Isoformen**  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  und  $\zeta$  identifiziert werden, wobei  $\alpha$  und  $\delta$  die phosphorylierten Isoformen  $\beta$  bzw.  $\zeta$  sind.<sup>[199,200]</sup> Alle Isoformen sind hochgradig konserviert und weisen eine hohe Sequenzhomologie auf.<sup>[201,202]</sup> Das Vorkommen der 14-3-3-Proteine ist ubiquitär

und kann in allen Eukaryoten nachgewiesen werden.<sup>[199,203,204]</sup> Die Expression der Hauptisoformen  $\alpha$ - $\eta$  erfolgt vermehrt im Gehirn und die der Isoformen  $\sigma$  und  $\tau$  in Epithel- und T-Zellen.<sup>[205]</sup> Mit der erfolgreichen Aufklärung der Kristallstruktur von 14-3-3 $\zeta$  konnte 1995 auch die Struktur der 14-3-3-Proteine aufgeklärt werden. Diese zeigt, dass die 14-3-3-Proteine aus neun antiparallelen  $\alpha$ -Helices (H1–H9)<sup>[204]</sup> aufgebaut sind und **Dimere** bilden (Abbildung 13).



**Abbildung 13.** 14-3-3 $\zeta$  Isoform aus der pdb 4IHL. Dargestellt ist das an den Buchstaben W erinnernde Dimer, dessen Helices nochmal einzeln farblich hervorgehoben sind. Links ist die Seitenansicht zu sehen mit den Furchen an den Innenseiten des Ws, rechts die Darstellung von oben mit Blick auf die Pore. Oben eingezeichnet sich die Abmaße (in Å) des Dimers. Unten ist die qualitative Darstellung des Oberflächenpotentials, rot azidisch, blau basisch.

Gleichzeitig fand man heraus, dass sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet werden können<sup>[206]</sup> (mit Ausnahme der tierischen  $\sigma$ -Isoform, die bevorzugt homodimer vorliegt<sup>[201]</sup>) und somit in eukaryotischen Zellen immer zumindest zwei Isoformen vorhanden sind.<sup>[205]</sup> Die Dimere bilden eine konkave Struktur, die an den Buchstaben W erinnert. Die Grenzfläche ist nicht komplett geschlossen und formt eine negativ geladene Pore, deren Funktion, wenn denn vorhanden, noch nicht erforscht ist. Die Dimerisierung wird durch die Helices **H1**, **H2** von Monomer A mit **H3** und **H4** von Monomer B maßgeblich über drei Salzbrücken, gebildet von Arg18–Glu89, Glu5–Lys74 und Asp21–Lys85, vermittelt.<sup>[204]</sup> Die **amphipatische Bindungsfurche** für die Partnerproteine liegt an den Innenseiten des Ws und wird durch die Helices **H3**, **H5**, die hauptsächlich polare Aminosäuren präsentieren, sowie **H7** und **H9**, die einige hydrophobe Aminosäuren bereitstellen, ausgeformt.<sup>[203,204]</sup> Besonders konserviert sind die Regionen der Dimerisierungsfläche und der Bindungsfurche. Die **leicht azidischen Proteine** (IP ca. 4–5) sind mit 25–30 kDa (Monomer) und mit

den Abmaßen von ca 32/57/58 (H/B/T) Å und einer Diagonalen von ca 67 Å, relativ klein; vergleiche dazu auch Abbildung 14.<sup>[203]</sup>

Die Funktion der **Adapterproteine** umfasst mit nahezu **200 Wechselwirkungen** die Regulation von verschiedenen Proteinen. Dabei können die 14-3-3 Proteine

- a) eine Konformationsänderung des Bindungspartners hervorrufen
- b) Protein Wechselwirkungen stabilisieren: 14-3-3 selbst dient hierbei als Ankermolekül oder Grundgerüst für andere Proteine
- c) durch die Maskierung von wichtigen Sequenzen am Partnermolekül dieses in seiner Funktionsweise inhibieren<sup>[204]</sup> oder in einem Zellkompartiment festsetzt (Sequestration)<sup>[207]</sup>

Die Interaktion mit den **Bindungspartnern** erfolgt über die Bindungsfurche mit der Erkennung von Bindungssequenzen, die meist phosphorylierte Serine oder Threonine enthalten.<sup>[199,203,206]</sup> Die Sequenzen der Partnerproteine der 14-3-3-Dimere lassen sich auf drei Bindungsmotive reduzieren. R[S/φ]<sup>b</sup>[+]pS/TXP (Mode I) und RX[φ/S][+]pS/TXP (Mode II) sind die entsprechenden Sequenzen der Mode I und Mode II Bindungspartner<sup>[208,209]</sup> Das Mode III Bindungsmotiv pS/pTX<sub>1-2</sub>-COOH liegt C-terminal und die Wechselwirkung mit 14-3-3 ist vergleichsweise schwächer.<sup>[204,210]</sup> Es sind nur wenige Bindungspartner bekannt, die dieses Motiv tragen, darunter die Kaliumionenkanäle TASK 1 und 3 oder die pflanzliche PMA2.<sup>[211–214]</sup> Zu den Bindungspartnern gehören u. a. Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Signalmoleküle, Proteine des Zytoskeletts und Tumorsuppressorproteine.<sup>[215–217]</sup>

Die Aktivität der 14-3-3-Proteine wird maßgeblich durch Phosphorylierung gesteuert.<sup>[199,218]</sup> Die Phosphorylierung selbst kann an vier verschiedenen Stellen durch Serin- oder Threonin-Kinasen erfolgen und zielt dabei auf zwei unterschiedliche Inhibierungsmechanismen ab:

- a) Monomerisierung
- b) Blockade der Bindungsfurche

Unmittelbar in der Dimerisierungsgrenzfläche führt eine Phosphorylierung der Serine 58 und 61 zur Bildung von Monomeren.<sup>[219–221]</sup> Serin184 und Serin/Threonin232 befinden sich in der Nähe der Bindungsfurche und eine Phosphorylierung der Reste hat eine verminderte Bindung der Partnerproteine zur Folge.<sup>[205,222,223]</sup> Zudem führt die Phosphorylierung von Threonin 232 in der 14-3-3ζ-Isoform zu einer strukturellen Veränderung des C-Terminus, was ebenfalls die Bindung zu anderen Proteinen einschränkt.<sup>[224]</sup>

14-3-3-Proteine erfüllen wichtige regulatorische Rollen in zwei Hauptgebieten: **Zellzyklus** und **intrazellulärer Proteintransport** (siehe dazu auch Abbildung 14).<sup>[216]</sup> Der Zellzyklus umfasst vier Phasen, in denen Zellwachstum, Proteinsynthese, die Replikation der DNS und Mitose erfolgen. Kontrollpunkte während des Zyklus stellen sicher, dass diese Phasen korrekt ablaufen und der Zyklus vor Beginn eines neuen Zyklus beendet wird. Die Zelle hat so die Möglichkeit, Fehler zu

<sup>b</sup>Aminosäureschlüssel: + basische, φ aromatische, X kann jede beliebige Aminosäure sein, aber typischerweise Leucin, Glutaminsäure, Alanin oder Methionin, im Fall von Mode III aber kein Prolin, pS ist phosphoryliertes Serin.

beheben oder in die Apoptose zu gehen. Cycline und Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDC) sind mit dafür verantwortlich, ob ein Kontrollpunkt passiert wird. Störungen im Zellzyklus oder der Kontrollverlust sind Basis für die Entstehung von Krebs.<sup>[225–227]</sup> 14-3-3-Proteine sind an mehreren Stellen in der Regulation des Zellzyklus beteiligt.<sup>[207]</sup> Voraussetzung für die Fortsetzung des Zellzyklus ist eine nacheinander abfolgende Aktivierung von CDCs, die durch bestimmte Phosphorylierungen entweder aktiviert oder inhibiert werden. Die Tyrosinkinase **WEE1** phosphoryliert Tyrosin15 von CDC2 und inhibiert diese dadurch. Die katalytische Aktivität von WEE1 wird durch die Wechselwirkung mit 14-3-3 erhöht. Ist also die Interaktion von 14-3-3 und WEE1 vermindert, ist die Aktivität von WEE1 reduziert, wodurch WEE1 keinen inhibitorischen Einfluss mehr auf CDC2 ausübt.<sup>[207,228,229]</sup> Durch eine Schädigung der DNS wird unter anderem die Aktivität von CDC2 unterdrückt, indem eine Phosphorylierung an den Threoninen 14 und 15 erfolgt. Die Aktivität von CDC2 kann durch eine Dephosphorylierung durch **CDC25C** an diesen beiden Resten wieder hergestellt werden. Durch Bindung von CDC25C an 14-3-3 wird das Protein inhibiert. Vermittelt wird die Interaktion durch pS216 und es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Bindung das NLS von CDC25C maskiert wird.<sup>[207,230–232]</sup> In diesem Beispiel wird zudem deutlich, dass 14-3-3 seine Partnerproteine unwirksam machen kann, indem es die Proteine in bestimmten Zellkompartments, wie dem Zytosol, festhält und die Proteine dadurch ihre Funktion nicht mehr ausüben können (**Sequestration**).<sup>[229]</sup> Demzufolge fördert eine herabgesetzte Interaktion von 14-3-3 mit sowohl WEE1 als auch mit CDC25C die Aktivität von CDC2, wodurch die Zelle dann weiter durch die Mitose geführt wird.<sup>[207]</sup> Eine weitere Konsequenz der DNS-Schädigung oder anderen zellulären Stresses ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors **p53**, der die Expression von Genen einleitet, die z. B. den Ablauf des Zellzyklus kontrollieren oder im Zusammenhang mit der Apoptose stehen. Im Grundzustand ist p53 an den Serinen 376 und 378 phosphoryliert. Als Folge der Aktivierung wird Serin 376 dephosphoryliert, wodurch eine Bindungsstelle für 14-3-3 um das Serin 378 frei wird. Durch die Komplexbildung von p53 und 14-3-3 werden sowohl die DNS-Bindungseigenschaft als auch die Transkriptionsaktivität von p53 erhöht und die Zelle letztlich in den Zellzyklusarrest geschickt.<sup>[217,233]</sup> Mitogene, wie der Insulin-abhängige Wachstumsfaktor I (IGF-I), regen die Zellproliferation an, indem Signalwege wie die **RAS-RAF-MEK-ERK**- oder die **PI3K-PKB/AKT**-Kaskade aktiviert werden. Die Aktivität von **C-RAF** wird in ersterer Kaskade durch 14-3-3 reguliert (die Wechselwirkung wird aufgrund der Relevanz in dieser Arbeit genauer in Abschnitt 2.2.2.1., S. 26ff erläutert). **AKT** (oder auch Proteinkinase B, PKB) ist ein Schlüsselprotein in dem PI3K-PKB-Signalweg und der nachgeschalteten Aktivierung zahlreicher Proteine, wie FOXO, BAD oder Ataxin.<sup>[215,234–236]</sup> Die drei genannten Proteine können jeweils durch die AKT-vermittelte Phosphorylierung wiederum mit 14-3-3 wechselwirken, wodurch 14-3-3 zusätzlich Einfluss auf Zelltod und -überleben nimmt. **FOXO** (*forkhead box O1*) sind weitere Transkriptionsfaktoren, die von 14-3-3 beeinflusst werden. Sie sind beispielsweise an der Regulation der Insulinfunktion beteiligt oder mediierten den Zellzyklusarrest. Durch die Bindung von FOXO4 an 14-3-3 wird zum einen die DNS-Bindungsdomäne maskiert und FOXO4 wird aus dem Zellkern ausgeschlossen.

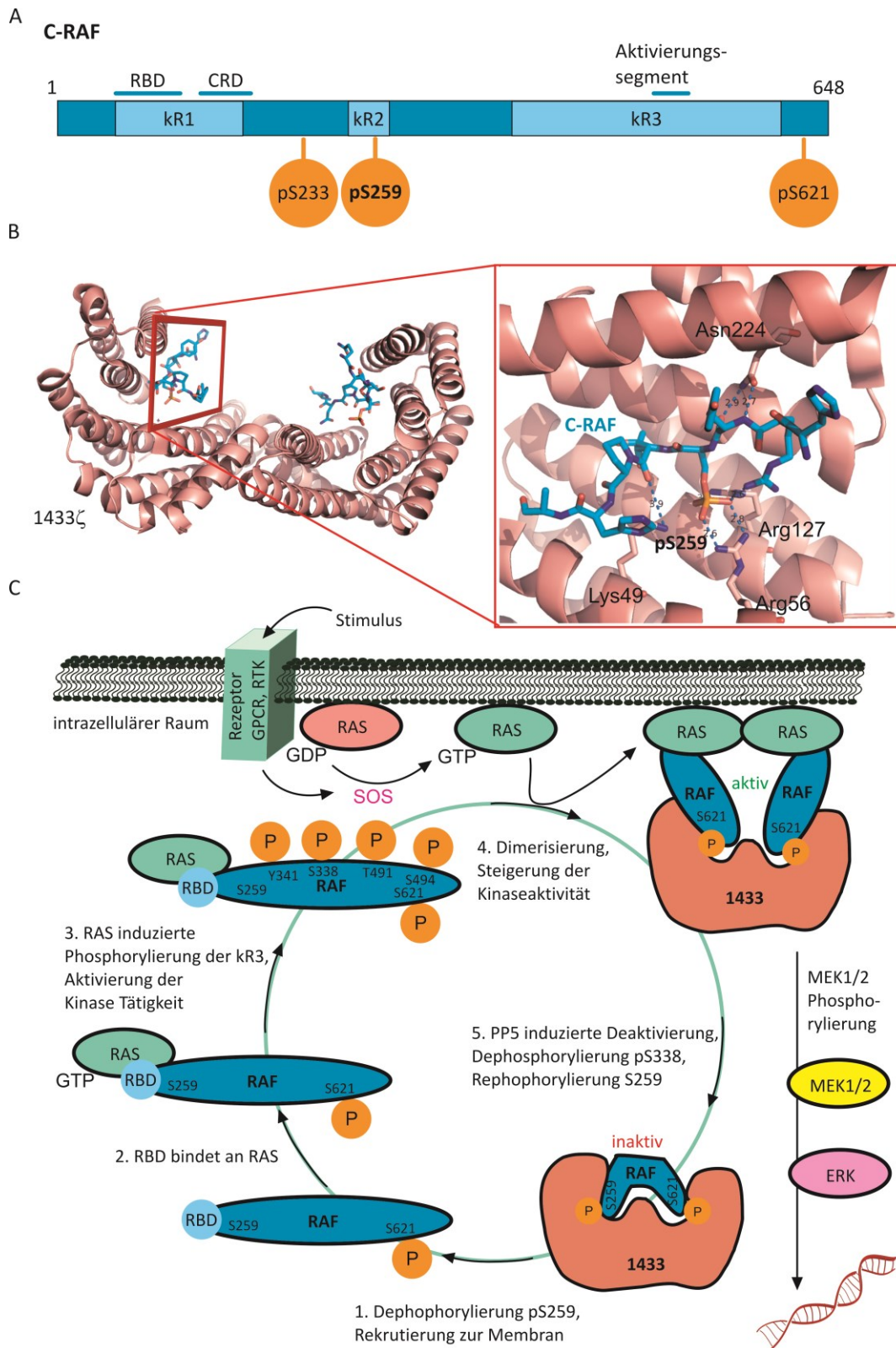




### 2.2.2.1. 14-3-3-C-RAF-Wechselwirkung

In dieser Arbeit wird versucht die Interaktion von C-RAF mit 14-3-3 $\zeta$  durch synthetische Liganden zu modulieren, weshalb diese Wechselwirkung an dieser Stelle genauer betrachtet werden soll. **C-RAF**, eine von drei Isoformen der RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) Protein-Familie, ist ca. 73 kDa groß (684 Aminosäuren) und kommt ubiquitär vor.<sup>[246]</sup> Das Protein weist drei konservierte Regionen (kR) auf (s. auch Abbildung 15A).<sup>[247]</sup> Die RAS-bindende Domäne (RBD) und die cysteinreiche Domäne (CRD) sind wichtig für Rekrutierung der C-RAF Kinase zur Plasmamembran. Die zweite Domäne (AS 251-266) umfasst eine von drei Bindestellen für das Regulatorprotein 14-3-3.<sup>[248–250]</sup> In der dritten konservierten Region (kR3) befindet sich die katalytische Kinase Domäne.<sup>[246]</sup> Die Aktivität von C-RAF wird insbesondere über Phosphorylierung gesteuert, die Einfluss auf die Konformation, die Zielbindungsstellen und Adapterstellen für das Regulatorprotein 14-3-3<sup>[208]</sup> nehmen.<sup>[251–253]</sup> Während die meisten Phosphorylierungen erst nach der Aktivierung von C-RAF durchgeführt werden, gibt es andere Aminosäuren, die im basalen, unstimulierten Status von C-RAF phosphoryliert sind.<sup>[254]</sup> Dazu gehören die Serine 259 und 621, durch die die Bindung zu 14-3-3 vermittelt wird. Die Phosphorylierung von Serin 621 scheint essentiell für die C-RAF-Aktivierung zu sein.<sup>[255]</sup> Durch die gleichzeitige Bindung an pS259 wird die C-RAF Aktivität jedoch unterdrückt. Die Phosphorylierung von S259 ist somit hemmend.<sup>[252,254–257]</sup> Für die Bindung von His6-14-3-3 $\zeta$ , also Histidin-markierten Protein, an das Peptidfragment FAM-C-RAF<sub>(254–264)</sub>pS259 konnte eine direkte Bindungskonstante von 16.7  $\mu$ M (FP) bestimmt werden.<sup>[258,259]</sup> Das nur um eine Arginin-Einheit kürzeres Fragment C-RAF<sub>(255–264)</sub>pS259 zeigt einen EC<sub>50</sub>-Wert von 11.7  $\mu$ M (ITC).<sup>[258]</sup>

Der mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg<sup>[260]</sup> ist direkt mit essentiellen Zellprozessen, wie Differenzierung, Proliferation oder Zellüberleben verbunden und wird bei Krebserkrankungen verstärkt aktiviert.<sup>[261]</sup> Ein Teil dieser Kaskade ist der **RAS-RAF-MEK-ERK**-Signalweg, wobei RAS in ca. 15 % der Krebsarten mutiert und ERK zu ca. 30 % hyperaktiviert ist. Eine vereinfachte, schematische Darstellung des C-RAF Aktivierungszyklus und des Signalwegs wird in Abbildung 15C wiedergegeben.<sup>[247]</sup> Im Zytosol liegt inaktives C-RAF in einer geschlossenen Konformation, gebunden über pS259 und pS621 an 14-3-3, vor.<sup>[253,262]</sup> Durch die Aktivierung von RAS durch den Guanin-Austauschfaktor SOS<sup>[263]</sup> werden die Phosphatasen PP1 und PP2A dazu veranlasst pS259 von RAF zu dephosphorylieren, wodurch C-RAF zur Membran rekrutiert wird.<sup>[256,264]</sup> Der N-Terminus von RAF wird frei und somit RBD, die spezifisch für GTP-aktiviertes RAS ist, für die Bindung mit RAS zugänglich.<sup>[265]</sup> Die anschließende Phosphorylierung der konservierten Region (kR3) führt zu der Aktivierung der Kinasetätigkeit des Enzyms, die durch Dimerisierung noch gesteigert wird.<sup>[266]</sup> Das Substrat von C-RAF ist MEK, welches wiederum phosphoryliert wird.<sup>[247,267,268]</sup> Die Deaktivierung wird durch die Bindung an die Protein-Phosphatase 5 (PP5), die über pS338 rekrutiert wird, vermittelt. Dabei wird pS338 de- und pS259 rephosphoryliert und RAF kehrt wieder in den basalen, inaktivierten Status zurück.<sup>[247,269]</sup>



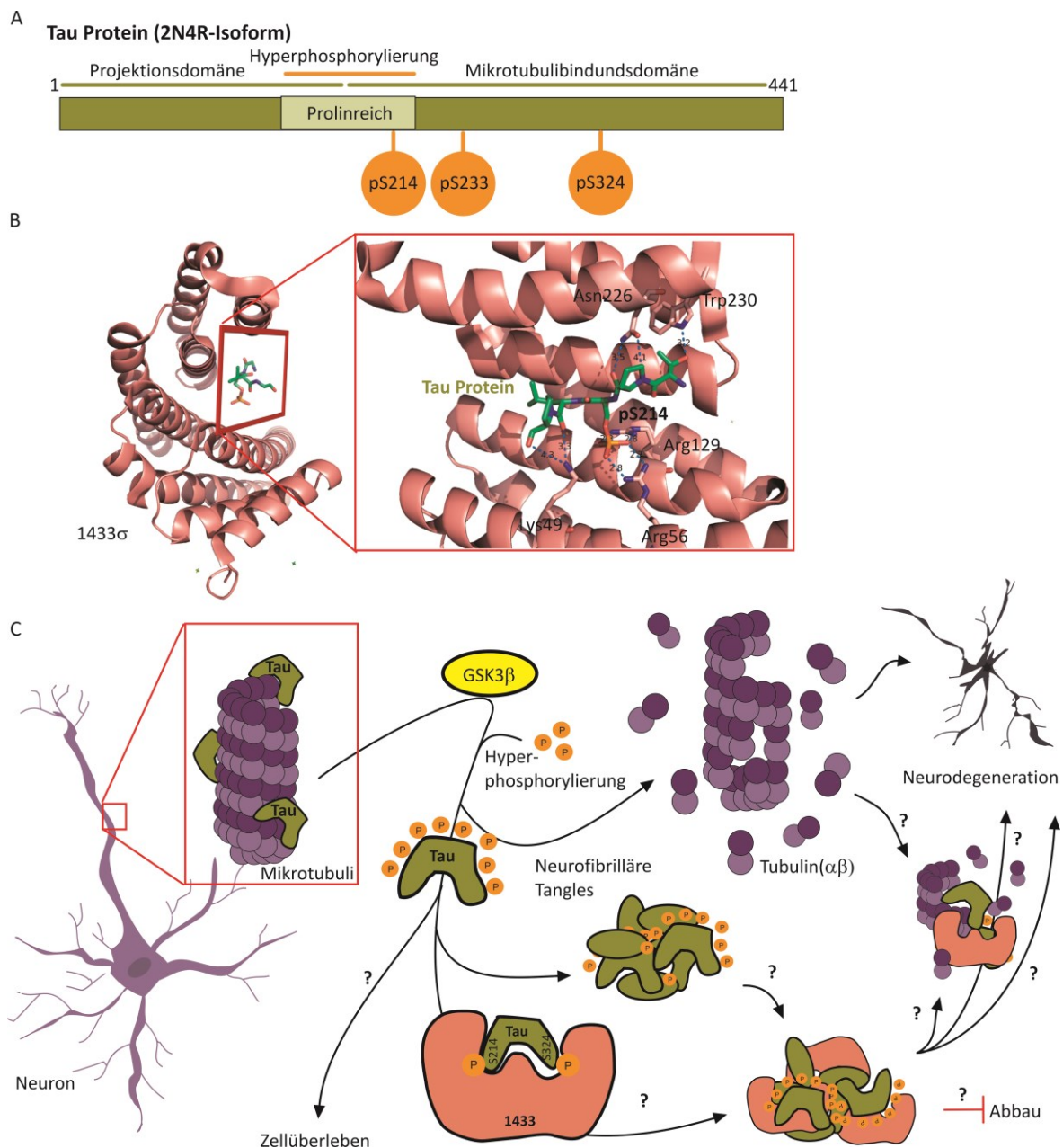
**Abbildung 15.** A) C-RAF mit RBD (RAS-Bindungs-Domäne), CRD (cysteinreiche Domäne; die Kinaseaktivität wird über die kR3 vermittelt; orange hervorgehoben sind die phosphorylierten Bindungsstellen für 14-3-3. B) Das 14-3-3ζ Dimer, blau C-RAF ein Fragment um das Bindungsmotiv Serin259 aus pdb 4IHL C) Schematische Darstellung des C-RAF Aktivierungszyklus<sup>[247]</sup> und der entsprechenden RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade.

#### 2.2.2.2. 14-3-3–Tau Protein-Wechselwirkung

Ein weiterer Bindungspartner von 14-3-3-Proteinen, der hier aufgrund der Relevanz in dieser Arbeit gesondert vorgestellt werden soll, ist das Tau Protein. Die alle auf einem Genort kodierten sechs Isoformen der Tau (*tubulin-associated unit*) Proteine werden durch alternatives Spleißen erhalten und umfassen 352–441 Aminosäuren mit Molekulargewichten von ca. 37–46 kDa sowie einem IP von 6.85–9.46.<sup>[270]</sup> Tau kommt vor allem in Neuronen vor und kann strukturell in zwei Domänen unterteilt werden.<sup>[271]</sup> Über die C-terminale Domäne wird die Bindung an die Mikrotubuli vermittelt und über die sogenannte Projektionsdomäne kann Tau Protein mit verschiedenen Proteinen in Kontakt treten, wodurch es an Signaltransduktions-Prozessen teilnehmen kann.<sup>[270,272,273]</sup> Mikrotubuli sind zytoskelettale Polymere, die aus Tubulin-Heterodimeren bestehen. Sie bestimmen die Form der Zelle und wirken, vermittelt durch die Interaktion mit MAPs (*microtubule-associated proteins*), an Zelltransport, -mobilität und -teilung mit.<sup>[274]</sup> Tau Proteine zählen mit über 80 % Anteil zu der größten Gruppe der MAPs und unterstützen in Neuronen das Mikrotubulisystem das Zellgrundgerüst zu bilden.<sup>[275]</sup> Die Phosphorylierung von Tau Protein nimmt Einfluss auf dessen biologische Aktivität. Im Zentrum des Proteins befindet sich eine prolinreiche Domäne, in der viele Serine und Threonine das Ziel spezieller Kinasen, wie GSK3 $\beta$ , CDK5 oder MAPK, sind.<sup>[276,277]</sup> Die abnormale Hyperphosphorylierung von Tau Proteinen ist wohl eine der Hauptursachen für die Zelldegeneration bei Alzheimer und kann mit einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen, den Tautopathien, in Verbindung gebracht werden. Eine Hyperphosphorylierung tritt insbesondere in der prolinreichen Region auf und die Auswirkungen scheinen paradox. Zum einen kann so vermutlich das Zellüberleben unterstützt werden und zum anderen kann eine Neurodegeneration ausgelöst werden.<sup>[275]</sup> Neuronen, die pro-apoptotischem Stress ausgesetzt sind, gehen normalerweise direkt in den Zelltod. Ist jedoch hyperphosphoryliertes Tau (hpTau) vorhanden, überleben die Zellen vorerst und verbleiben in einem degenerativen Zustand, einer Art chronischem Zelltod.<sup>[278]</sup> Dafür könnten verschiedene zelluläre und metabolische Mechanismen verantwortlich sein, die jedoch bislang eher spekulativ sind. *Li et al.* konnten jedoch zeigen,<sup>[275,278]</sup> dass durch die Hyperphosphorylierung von Tau die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, ein Zellüberlebensfaktor, verhindert werden kann, da beide miteinander in Konkurrenz um die Bindung zu der Kinase GSK3 $\beta$  stehen. *Wang et al.* vermuten in ihrem 2015 veröffentlichten Aufsatz, dass der Übergang von Zellüberleben zu Zelldegeneration bloß durch Zellseneszenz vermittelt wird.<sup>[279]</sup> Die Zelldegeneration ist mitunter darauf zurückzuführen, dass hpTau weder den Mikrotubulizusammenhalt unterstützen noch an die Mikrotubuli binden kann.<sup>[280,281]</sup> Die Mikrotubuli verlieren ihre Integrität und Disassemblieren, was dazu führt, dass die Zellstruktur zerstört wird (vgl. Abbildung 16).<sup>[282]</sup> Tau ist zudem der Hauptbestandteil von gepaarten helicalen Filamenten, die wiederum zu neurofibrillaren Tangles (NFT) aggregieren können. NFTs und amyloide Plaques sind wiederum kennzeichnend für Alzheimer.<sup>[283–288]</sup> 14-3-3 $\zeta$  konnte ebenfalls in NFTs nachgewiesen werden.<sup>[289]</sup> Es stellte sich heraus, dass 14-3-3 $\zeta$  nicht nur mit Tau innerhalb der NFTs assoziiert vorlag und überexprimiert wurde, sondern auch Einfluss auf die Phosphorylierung



von Tau Proteinen nimmt.<sup>[281,282,290]</sup> Die Wechselwirkung zwischen Tau Protein und 14-3-3 $\zeta$  wird dabei über pS214, welches sich im prolinreichen Teil der Mikrotubuli-bindenden Domäne befindet, vermittelt.<sup>[281]</sup> Als weitere Bindungsstellen konnten die Regionen um pS233 und pS324 identifiziert werden.<sup>[290,291]</sup> Joo *et al.* fanden in ihren Studien heraus,<sup>[290]</sup> dass es zu einem verminderten Axon-Wachstum kommt, liegt 14-3-3 $\sigma$  überexprimiert vor. Zudem deuteten Studien in Neuroblastomen-Zelllinien darauf hin, dass die Mikrotubulistabilität vermindert sein könnte. Die Forscher spekulieren weiter, dass durch die Wechselwirkung mit 14-3-3 $\sigma$ , Tau Protein vor proteosomalen Abbau geschützt werden könnte. Insgesamt bleibt die Rolle von 14-3-3 jedoch unklar und viele Mechanismen hypothetisch.

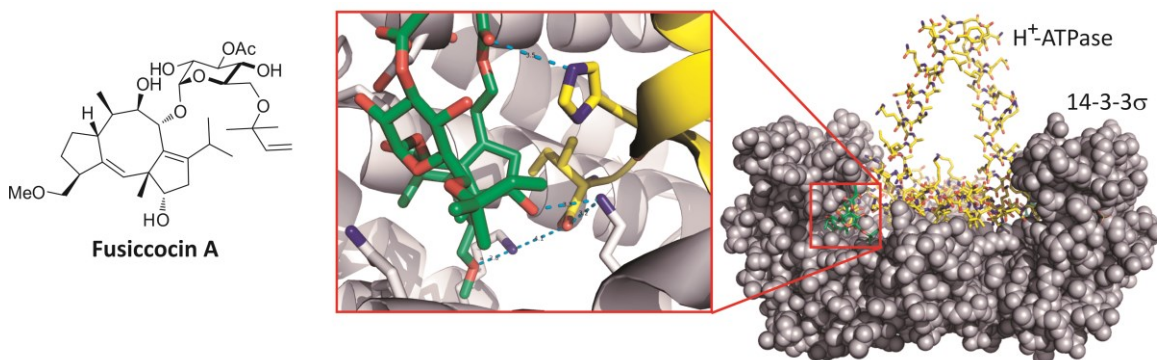


**Abbildung 16.** A) schematische Darstellung der Tau Protein-Domänen, orange hervorgehoben sind die phosphorylierten Serine, über die eine Wechselwirkung mit 14-3-3 stattfinden kann. B) Kristallstruktur von 14-3-3 $\sigma$  mit dem Tau Peptidfragment um pS214 (pdb 4F5L). C) vereinfachte schematische Abbildung der möglichen Zusammenhänge von Tau und 14-3-3. Viele Mechanismen und Hintergründe sind spekulativ.

### 2.2.2.3. Modulatoren von 14-3-3-Wechselwirkungen

Wie beschrieben wurde, handelt es sich bei 14-3-3 um ein regulativ agierendes Adapterprotein, welches an einer Vielzahl von Zellprozessen beteiligt ist. Dadurch steht es gleichzeitig im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen wie Krebs oder neurodegenerativen Störungen, wodurch 14-3-3 zu einem vielversprechenden Ziel neuer therapeutischer Ansätze wird.<sup>[215,217,292–296]</sup> Im folgenden Abschnitt werden einige Disruptoren und Stabilisatoren von 14-3-3-Wechselwirkungen vorgestellt.

**Fusicoccin A (FC-A)** ist ein glykosidisches Diterpen, dass ein Welken von Blättern induziert, durch unkontrolliertes Öffnen der Stomata, über die Pflanzen transpirieren. Es wurde erstmals in den 1960er Jahren als ein solches Welken-induzierendes Toxin beschrieben und kann aus dem phytopathogenen Pilz *Phomopsis amygdali* (vorher *Fusicoccum amygdali*) gewonnen werden.<sup>[297,298]</sup> Vermittelt wird dieses Verhalten über eine irreversible Aktivierung der Plasma-Membran- $H^+$ -ATPase (PMA) durch eine Stabilisierung des Komplexes aus PMA und 14-3-3. Die Kristallstruktur (pdb 2O98)<sup>[299]</sup> zeigt, dass FC-A am Rand der Interaktionsfläche zwischen PMA und 14-3-3 bindet (Abbildung 17) und gleichzeitig mit beiden Interaktionspartnern interagiert.<sup>[213,299]</sup> Dabei ist deutlich sichtbar, dass FC-A direkt mit dem C-Terminus (Mode III Bindungsmotiv) von PMA wechselwirkt.<sup>[300]</sup> Die Bindungsaffinität von PMA und 14-3-3 kann in Anwesenheit von FC-A um den Faktor 90 erhöht werden.<sup>[213]</sup> Die Bindung von FC-A an den Komplex ist zudem deutlich stärker ( $K_D=700$  nM) als an die einzelnen Interaktionspartner (14-3-3:  $K_D = 66$   $\mu$ M, PMA nicht messbar).<sup>[71,299]</sup>



**Abbildung 17.** FC-A im Komplex mit 14-3-3 und PMA (pdb 2O98).<sup>[299]</sup>

Durch das Screening einer 37000 Komponenten umfassenden Molekülbibliothek wurden zwei weitere Stabilisatoren, **Epibestatin** und **Pyrrolidone 1**, der 14-3-3/PMA2-Wechselwirkung identifiziert. Die Kristallstrukturen der ternären Komplexe (pdb 3M50 und 3M51) zeigen, dass die Komponenten zwar nicht an identischen Stellen des Grenzflächenrandes binden, aber an nebeneinanderliegenden.<sup>[301]</sup> Durch eine Optimierung von Pyrrolidone 1, dessen Pyrrolidon-Grundgerüst in das viel rigidere Pyrazol überführt wurde (**33**), konnte die Stabilität des Komplexes um das dreifache gesteigert werden.<sup>[302]</sup>

Der humane Östrogen-Rezeptor alpha (**ER $\alpha$** ) – ein Transkriptionsfaktor verantwortlich für Zellproliferation in bis zu 75 % aller Brustkrebsarten – weist C-terminal eine Sequenzhomologie zu PMA auf. Daher untersuchten *de Boer et al.* den Einfluss von FC-A auf die 14-3-3/ER $\alpha$ -Wechselwirkung und stellten dabei fest,<sup>[303]</sup> dass FC-A den Komplex stabilisiert und so die Estradiol-stimulierte Dimerisierung von ER $\alpha$  unterdrückt, und die ER $\alpha$ /Chromatin-Wechselwirkung und dadurch auch die Gen Expression inhibiert. Letztlich konnte eine verminderte Proliferation der Zellen beobachtet werden. Die Kristallstruktur des ternären Komplexes (pdb 4JDD) zeigt einen ähnlichen Bindungsmodus von FC-A an die Komplexe aus 14-3-3 und PMA bzw ER $\alpha$ .

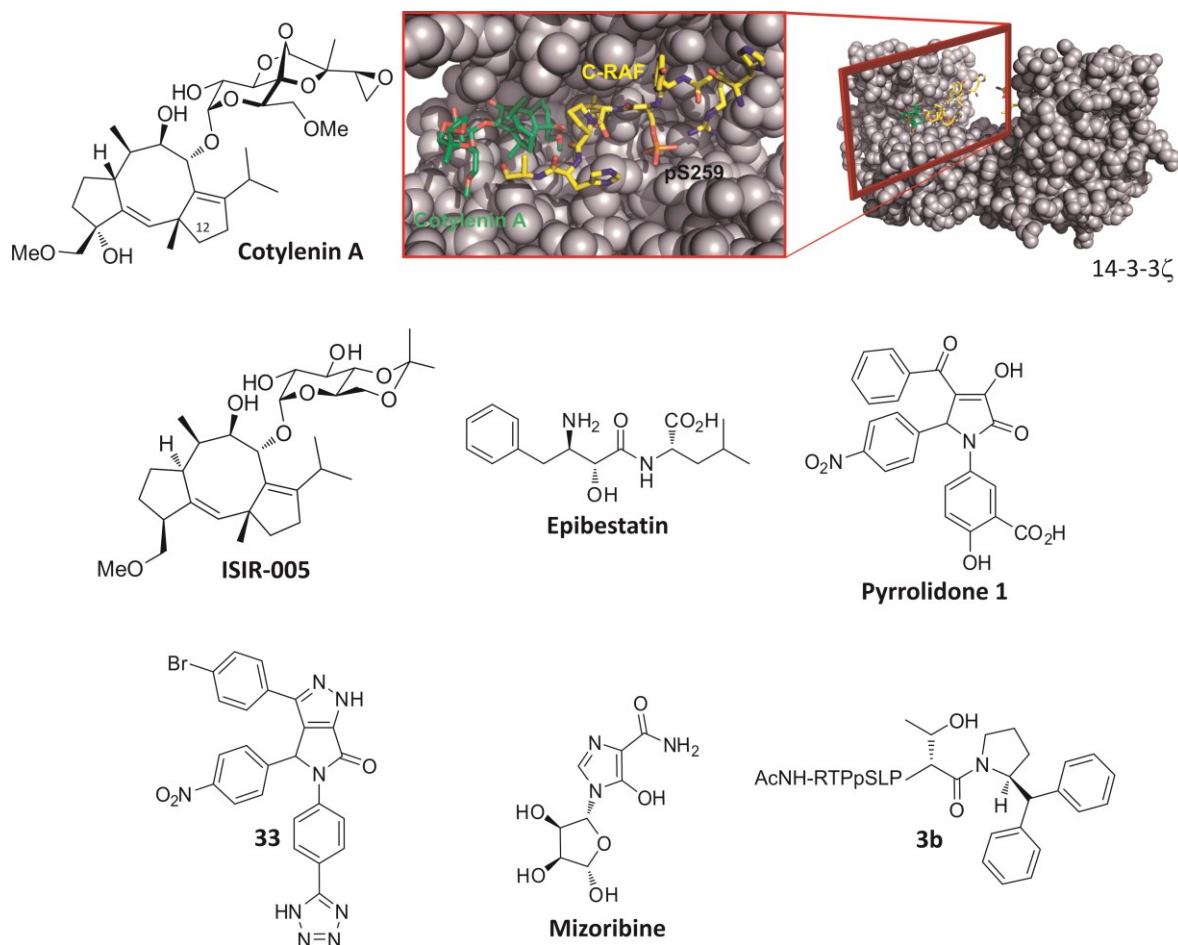
Die insbesondere von Zellen im zentralen Nervensystem exprimierten Kaliumionenkanäle **TASK-1** und **TASK-3** können durch die Wechselwirkung mit 14-3-3 aktiviert werden, indem die Kanäle an der Oberfläche exprimiert werden.<sup>[214,304]</sup> Verschiedene semisynthetische FC-A-Derivate wurden verwendet, um die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\sigma$  und einem TASK-Peptidfragment KRRKpSV, ebenfalls ein C-terminales Mode III-Bindungsmotiv, zu untersuchen. Keines der Derivate konnte zwar die Affinität der Bindung so steigern wie FC-A selbst (um Faktor 29), allerdings konnte so gezeigt werden, dass der glykosidische Rest wichtig für die vermittelte Stabilisierung ist.<sup>[305]</sup> Zusätzlich wurde der stabilisierende Einfluss von FC-A auf die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und **GPIIb $\alpha$** , ein weiteres Mode III-Bindungsmotiv-tragenes Protein, nachgewiesen. Das macht FC-A zu einer guten Leitstruktur für Stabilisatoren von 14-3-3/Mode III-Proteinen.<sup>[300,306]</sup>

Die natürliche Verbindung **Cotylenin A (CN-A)** wird vom Pilz *Cladosporium* sp. 501-7W produziert und ist strukturell FC-A sehr ähnlich. CN-A ist ein Stabilisator der **14-3-3 $\zeta$ /C-RAF**-Wechselwirkung (Abbildung 18). Für die Wechselwirkung von CN-A mit 14-3-3 $\zeta$  im Komplex mit dem C-RAF<sub>(229-264)</sub>pS233,pS259-Fragment konnte ein EC<sub>50</sub>-Wert von 65  $\mu$ M bestimmt werden. Die Stabilität des Komplexes kann dabei in Anwesenheit von CN-A (500  $\mu$ M) um das 17-fache gesteigert werden.<sup>[307]</sup> Für das kürzere Peptidfragment **C-RAF<sub>(254-264)</sub>pS259** beträgt der EC<sub>50</sub>-Wert 257  $\mu$ M.<sup>[258]</sup> Die Bindung von CN-A zu 14-3-3 $\zeta$  wird über polare Interaktionen der Aminosäuren Asn42, Lys120 und Asp231 vermittelt bzw. über Thr234 und Pro235 zu C-RAF. CN-A wurde im Zusammenhang mit der humanen, akuten myeloiden Leukämie untersucht und zeigte sowohl in Zellkulturen als auch in Mäusemodellen eine Differenzierung der Zellen.<sup>[308,309]</sup> In Kombination von CN-A mit Rapamycin oder Interferon  $\alpha$  konnte Tumorwachstum in Brustkrebsstudien gestoppt bzw. im Falle von Lungen- und Eierstockcarzinomen verzögert werden.<sup>[310,311]</sup>

**ISIR-005**, eine von CN-A abgeleitete semi-synthetische Verbindung, stabilisiert die Wechselwirkung von 14-3-3 $\zeta$  und **Gab2** um den Faktor 5.<sup>[312]</sup> Die Kristallstruktur (pdb 5EXA) des ternären Komplexes aus ISIR-505/14-3-3 $\zeta$ /Gab2pT391 zeigt, dass ebenfalls beide Interaktionspartner nebeneinander, tief in der 14-3-3 $\zeta$ -Bindungsfurche liegen.

Das imidazol-Nukleosid **Mizoribine** wurde erstmals 1974 in Japan aus *Eupenicillium brefaldianum* isoliert.<sup>[313]</sup> Der immunsuppressive Wirkstoff wird dort unter anderem bei Nierentransplantationen angewendet.<sup>[314–316]</sup> Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass

Mizoribine als Stabilisator der Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\eta$  und dem **Glucocorticoid-Rezeptor** fungiert.<sup>[317]</sup>

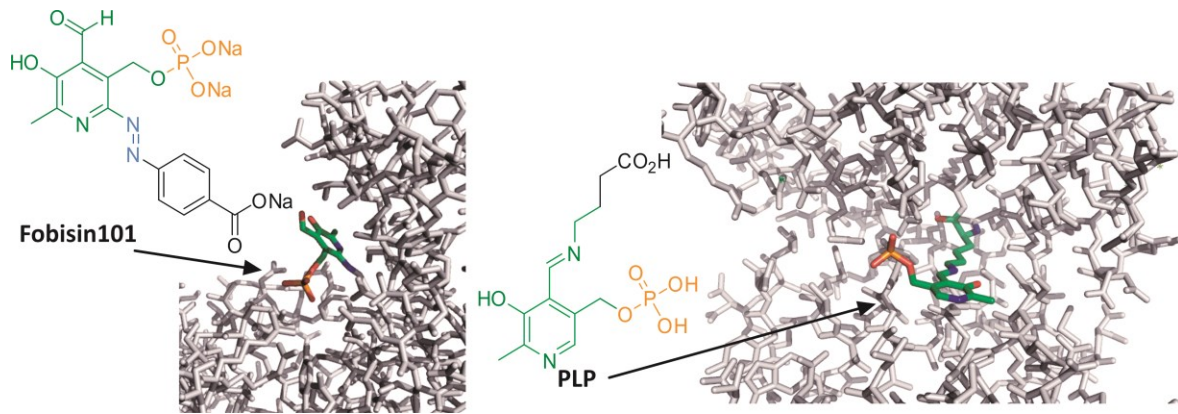


**Abbildung 18.** Ansicht Komplex 14-3-3 $\zeta$  Dimer mit Cotylenin A (grün) und Raf (gelb) pdb 4IHL Strukturen verschiedener Stabilisatoren und des von einem Stabilisator abgeleiteten Inhibitors **3b**.

Ottmann *et al.* stellten 2015 einen **Inhibitor** für die **Tau Protein/14-3-3**-Wechselwirkung vor,<sup>[318]</sup> der von dem Stabilisator FC-A mit Hilfe aus der Kristallstruktur des binären Komplexes aus 14-3-3 $\sigma$  und FC-A abgeleitet wurde. Der Ligand **3b** weist einen IC<sub>50</sub>-Wert von 5.9  $\mu$ M (FP) und bindet 14-3-3 alleine mit einem K<sub>D</sub>-Wert von 13.4  $\mu$ M (ITC). Durch Analyse der Kristallstruktur zeigte sich, dass das *R*-konfigurierte Epimer, eigentlich ein Nebenprodukt der Synthese, an 14-3-3 $\sigma$  in der Bindungsfurche bindet und so die Wechselwirkung der 14-3-3-Proteine mit seinen Bindungspartnern blockiert.

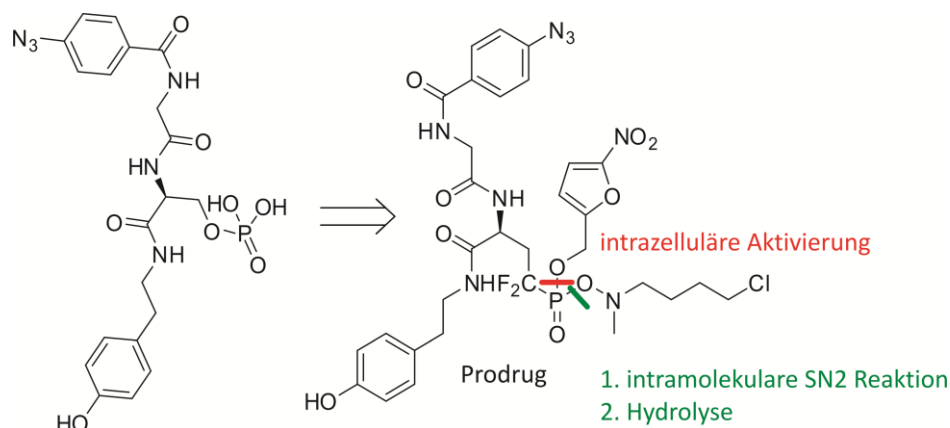
**Fobisin101** (Fourteen-three-three-Binding-Small Molecule Inhibitor) bindet kovalent an Lys120 von 14-3-3-Proteinen in der Bindungsfurche der Bindungspartner (Abbildung 19) und verhindert so deren Wechselwirkung (pdb 3RDH).<sup>[319]</sup> Ottmann *et al.* konnten ein weiteres Pyridoxalphosphat **PLP** identifizieren, das in vergleichender Weise wie Fobisin101 kovalent an 14-3-3 $\sigma$  bindet (pdb 3U9X).<sup>[320]</sup> Die kovalente Bindung von Molekülen in der Nähe der Phosphoserin/Phosphothreonin Bindungsstelle ist sicherlich effektiv, allerdings auch unselektiv, da alle weiteren Wechselwirkungen permanent unterbunden werden.





**Abbildung 19.** Fobisin101 (pdb 3RDH)<sup>[319]</sup> und PLP (pdb 3U9X)<sup>[320]</sup> inhibieren 14-3-3-Proteine durch kovalente Bindung in der Bindungsfurche.

Ausgehend von der bekannten 14-3-3-bindenden Peptidsequenz RFRpSYPP entwickelten *Yao et al.* 2010 eine kombinatorische Molekülbibliothek mit dem Ziel einen zellgängigen Inhibitor für **14-3-3 $\sigma$**  zu finden.<sup>[321]</sup> Dabei wurden die Peptidfragmente vor und nach dem phosphorylierten Serin variiert. Die Substanzen wurden mittels Microarray- und FP-Assay untersucht und als potentester Inhibitor konnte Ligand **2-5** ( $IC_{50} = 2.6 \mu M$ ) identifiziert werden. Ligand 2-5 diente *Borch et al.* als Leitstruktur für die Entwicklung eines **Prodrugs**systems (Abbildung 20).<sup>[322]</sup> Die Untersuchungen zeigten, dass der Phosphoserinligand die **14-3-3/FOXO3a**-Wechselwirkung in Zellen unterbrechen kann. *Imoto et al.* suchten 2006 einen Inhibitor der Migration von Krebszellen.<sup>[323–325]</sup> Durch die Bindung von **UTKO1** wird **14-3-3 $\zeta$**  inaktiv, wodurch die zweite EGF-eingeleitete Phase der Rac1-Aktivierung inhibiert wird. Die Autoren spekulierten über die genaue Rolle von 14-3-3 $\zeta$  in dem Mechanismus und vermuteten, dass **Tiam1** der Bindungspartner des Proteins sei. Dies konnte schließlich in einem GST-Pulldown-Assay bestätigt werden.



**Abbildung 20.** Inhibitor 2-5 und das Prodrugsystem; UTKO1.

Mit einer molekularen **Pinzette** sollte die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\sigma$  und verschiedenen Partnerproteinen (**C-RAF** und **ExoS**) gestört werden,<sup>[326]</sup> indem auf der 14-3-3-Proteinoberfläche präsente Lysine gebunden werden. Die molekulare Pinzette formt eine elektronenreiche Kavität und weist negativ geladene Hydrogenphosphatgruppen auf. Die positiv geladenen Lysin-Gruppen können so wie in Abbildung 21 gezeigt, gebunden werden. Die Disruption der Wechselwirkung

wurde mittels FP ( $IC_{50} = 480 \mu\text{M}$  für C-RAF und  $520 \mu\text{M}$  für ExoS) untersucht. Die Kristallstruktur (pdb 4HQW) zeigt, dass die Pinzette nur an Lys214 des 14-3-3 $\sigma$  Proteins bindet.

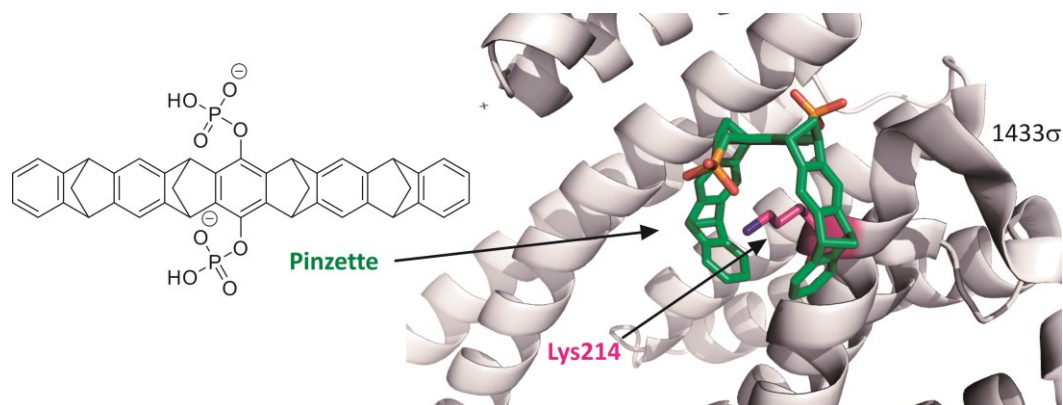


Abbildung 21. Molekulare Pinzette.

Die Tyrosinkinase **c-Abl** pendelt zwischen Zytoplasma und Zellkern und hat unter anderem die Aufgabe, bei längerem Verweilen oder Akkumulation im Zellkern (z. B. durch DNS-Schädigung) die apoptotische Signalkaskade zu aktivieren.<sup>[327]</sup> 14-3-3 bindet im Zytoplasma an c-Abl und verhindert so dessen Migration in den Zellkern.<sup>[328]</sup> Bei DNS-Schädigung, so fanden *Yoshida et al.* heraus, ruft die Kinase JNK die Phosphorylierung von 14-3-3-Proteinen hervor.<sup>[329,330]</sup> Dadurch wird die Wechselwirkung zu c-Abl aufgehoben, c-Abl gelangt in den Zellkern und kann gegebenenfalls die Apoptose einleiten. 14-3-3 reguliert also die Lokalisation von c-Abl und nimmt so auch mit Einfluss auf die Apoptose, als Antwort auf gentoxischen Stress. *Botta et al.* fand 2010 im Rahmen eines *in silico* Screenings einer kommerziell erhältlichen Substanzbibliothek mit der 14-3-3 $\sigma$  Kristallstruktur den ersten Inhibitor der 14-3-3/c-Abl Wechselwirkung **BV02**, der in anschließenden Zellassays  $LD_{50}$ -Werte im unteren mikromolaren Bereich aufwies.<sup>[331]</sup> Allerdings fand die *Botta*-Gruppe heraus, dass BV02 bei Raumtemperatur zu einem entsprechenden Phthalimid **34** zyklisieren kann (Abbildung 22), wobei zunächst nicht klar war, welche der beiden Formen, zyklisch oder offen, nun die biologisch aktive Form ist.

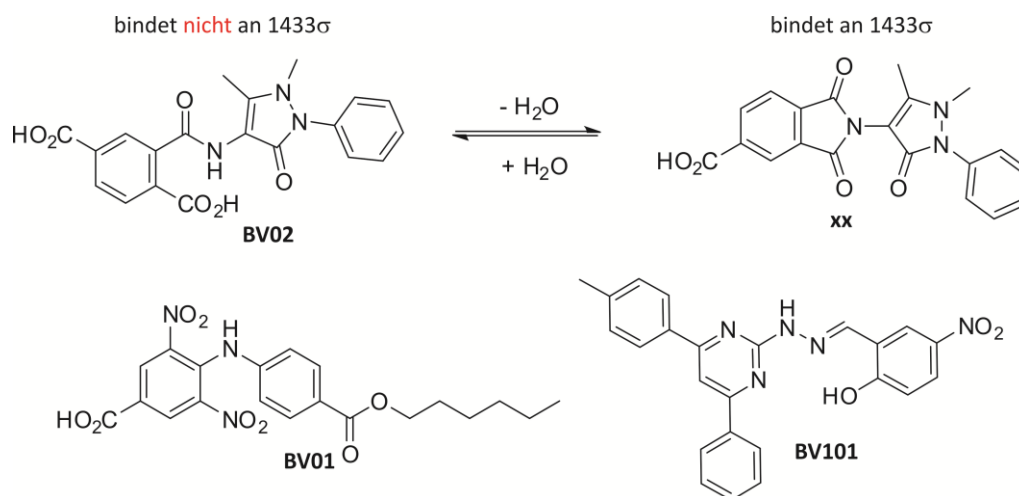


Abbildung 22. Inhibitoren der 14-3-3/cAbl-Wechselwirkung.

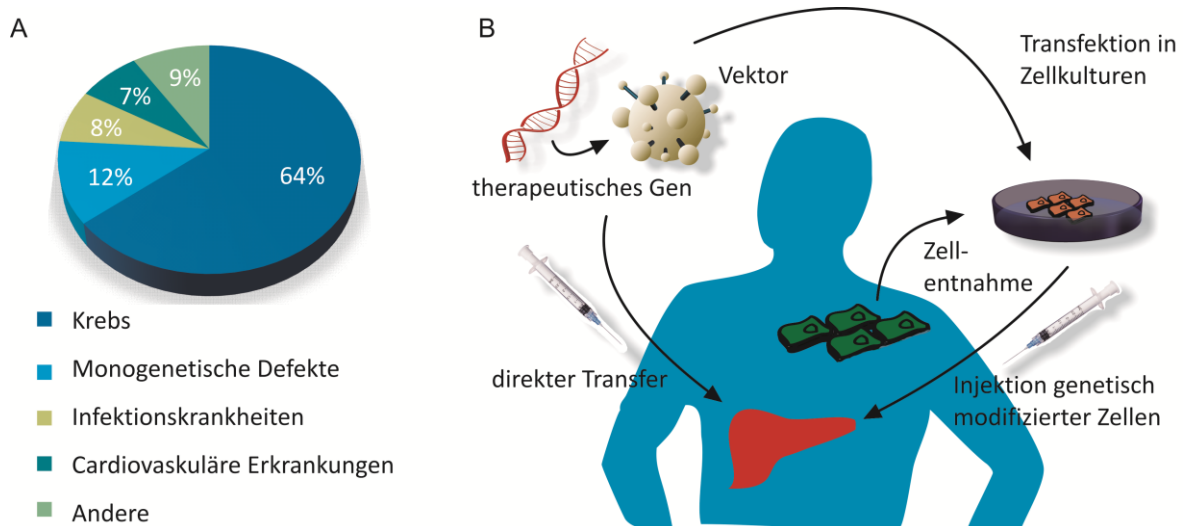
Trotzdem wurde BV02 als Referenzinhibitor von anderen Arbeitsgruppen für pathobiologische Studien von 14-3-3 verwendet.<sup>[292,332,333]</sup> 2016 veröffentlichten *Botta et al.* dann ihre Ergebnisse zu NMR-spektroskopischen Bindungsstudien von BV02 und des zyklischen Derivats mit 14-3-3 $\sigma$ . Interessanterweise zeigte sich, dass tatsächlich die zyklische Form an das Protein binden kann, *nicht* BV02. Gleichzeitig wurde auch festgestellt, dass durch die Bindung des Phthalimidderivats an 14-3-3 $\sigma$  die Konversion zu BV02 unterdrückt wird.<sup>[334]</sup> **BV01** und **BV101** sind weitere Inhibitoren der Wechselwirkung, die von der Gruppe gefunden wurden und die LD<sub>50</sub>-Werte im unteren mikromolaren und oberen nanomolaren Bereich aufwiesen.<sup>[331]</sup> In Tabelle 2 sind die meisten bekannten Modulatoren von 14-3-3-Wechselwirkungen aufgelistet, womit das Kapitel Protein-Protein-Interaktionen und seine Modulation abgeschlossen wird. Das nächste Kapitel widmet sich dem zweiten großen Forschungsgebiet, das in dieser Arbeit thematisiert wird – der Gentransfektion.

**Tabelle 2.** Auflistung einiger Modulatoren von 14-3-3-Wechselwirkungen

Modulator	1433 Bindungspartner	pdb-Code	Aktivität	Assay
<b>Stabilisator</b>				
<b>FC-A</b>	PMA2	2O98	K <sub>D</sub> 700 nM <sup>[213]</sup>	ITC
	ER $\alpha$	4JDD	K <sub>D</sub> 100 nM <sup>[303]</sup>	FP, kompetitiv
	TASK3	3P1O	EC <sub>50</sub> 1.9 $\mu$ M, K <sub>D</sub> 5 nM <sup>[305]</sup>	FP
	GPIb $\alpha$		K <sub>D</sub> 16 $\mu$ M <sup>[306]</sup>	Kompetitiver Assay
<b>CN-A</b>	RAF <sub>254-264</sub> pS259	4IHL	EC <sub>50</sub> 257 $\mu$ M <sup>[258]</sup>	FP
	RAF <sub>229-264</sub> pS233pS259		EC <sub>50</sub> 65 $\mu$ M <sup>[307]</sup>	FP
	PMA2	3E6Y	K <sub>D</sub> 2.5 $\mu$ M <sup>[335]</sup>	ITC
<b>ISIR-005</b>	Gab2pT391	5EXA	K <sub>D</sub> 1.25 $\mu$ M <sup>[312]</sup>	Kompetitiver Assay
<b>Pyrrolidon</b>	PMA2	3M51	K <sub>D</sub> 80 $\mu$ M <sup>[301]</sup>	SPR
<b>Epibestatin</b>	PMA2	3M50	K <sub>D</sub> 1.8 $\mu$ M <sup>[301]</sup>	SPR
<b>Mizoribine</b>	Glucocorticoid Rezeptor			GST-PulldownAssay <sup>[317]</sup>
<b>Disruptor</b>				
<b>3b</b>	Tau Protein		IC <sub>50</sub> 5.9 $\mu$ M, K <sub>D</sub> 13.4 $\mu$ M <sup>[318]</sup>	FP, ITC
<b>Fobisin101</b>	kovalente Bindung an1433	3RDH		
<b>PLP</b>	kovalente Bindung an 1433	3U9X		
<b>2-5</b>	TMR-GGRLSHpSSLPG-NH <sub>2</sub>		IC <sub>50</sub> 2.6 M <sup>[321]</sup>	FP, GST-Pulldown
<b>Prodrug</b>	FOXO3a			zellbasierter Assay <sup>[322]</sup>
<b>UTKO1</b>	Tiam1			GST-Pulldown Assay <sup>[323,324]</sup>
<b>Tweezer</b>	ExoS	4HQW	IC <sub>50</sub> 520 $\mu$ M <sup>[326]</sup>	FP
	C-RAF		IC <sub>50</sub> 480 $\mu$ M <sup>[326]</sup>	FP
<b>34</b>	direkte Bindung			NMR <sup>[334]</sup>
<b>BV01</b>	cAbl		LD <sub>50</sub> 1.41 $\mu$ M <sup>[331]</sup>	zellbasierter Assay
<b>BV101</b>	cAbl		LD <sub>50</sub> 0.65 $\mu$ M <sup>[331]</sup>	zellbasierter Assay

### 2.3. Gentransfektion

Eher zufällig isolierte *Miescher* 1869 eine Substanz aus Leukozyten, die er *Nuklein* nannte und deren Eigenschaften sich vollkommen von denen der Proteine unterschieden.<sup>[336]</sup> 1944 postulierten *Avery, MacLeod und McCarty*, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Träger des Erbguts sei.<sup>[337]</sup> Die Strukturaufklärung der DNS durch *Watson und Crick* 1953,<sup>[338,339]</sup> basierend auf Röntgenbeugungsdaten von *Franklin* und ursprünglichen Studien von *Wilkins*, stellt eine der größten wissenschaftlichen Durchbrüche des letzten Jahrhunderts dar.<sup>[340–343]</sup> Kurz darauf, Ende der 1960er Jahre, ermöglichte die Entschlüsselung des genetischen Codes das Verständnis der Proteinbiosynthese auf molekularer Ebene.<sup>[344–348]</sup> 2003 wurde im Rahmen des 1990 gegründeten *Human Genome Projects* die Sequenzierung und Kartografierung aller 25000 Gene des Menschen – die zusammen unser Genom ergeben – abgeschlossen.<sup>[349–353]</sup> Mit der sich entwickelnden Forschung auf dem Gebiet der DNS kommt man dem Verständnis der genetischen Basis vieler Krankheiten immer näher. So hat die **Gentherapie** das ehrgeizige Ziel, die genetische Ursache von Erkrankungen, wie beispielsweise Mukoviszidose, Hämophilie, Sichelzellenanämie, Adenosindesaminase-Mangel mit schwerem kombinierten Immundefekt, Muskeldystrophie oder Krebs, selbst zu korrigieren, d. h. nicht ausschließlich die Symptome von Erbkrankheiten oder Krankheiten, die durch Veränderungen des Erbguts hervorgerufen werden, behandeln. Die praktische Umsetzung dieses Ziels gestaltet sich als herausfordernd und ist dementsprechend von Rückschlägen gezeichnet.<sup>[354–359]</sup> Mittlerweile befinden sich über 2000 Verbindungen in klinischen Studien<sup>[354,355,359]</sup>, wobei etwa  $\frac{2}{3}$  aller dieser sogenannten Transfektionsvektoren für die Therapie von Krebs entwickelt wurden, gefolgt von monogenetischen Defekten, Infektionskrankheiten und kardiovaskulären Erkrankungen (Abbildung 23A).<sup>[360]</sup>



**Abbildung 23.** A) prozentuale Verteilung der durch Transfektionsvektoren adressierten Krankheiten.<sup>[360]</sup> B) Schematische Darstellung der direkten und zellbasierten Gentransfektion.<sup>[355]</sup>

Bei der **somatischen Gentherapie** wird genkodierende DNS oder RNS in Somazellen, also differenzierte Körperzellen, eingebracht, um dort defekte Gene zu ersetzen, neue Gene einzufügen oder die Expression von bestehenden Genen zu unterdrücken. Der Vorgang des Einschleusens



genetischen Materials in Zellen, wird als Transfektion bezeichnet. Prinzipiell ist dies auch mit Embryonal- oder Keimzellen möglich, da aber die neuen Gene so weitervererbt werden könnten, ist die **Keimbahn-Gentherapie** aus ethischen Gründen verboten. Das Transgen kann entweder direkt in das Zielgewebe oder -organ, wie beispielsweise die Leber, eines Patienten injiziert werden oder wird *ex vivo* in von einem Patienten entnommenen Zellen transfiziert. Die genetisch modifizierten Zellen werden dann in Zellkulturen vervielfältigt und danach erst wieder dem Patienten appliziert.<sup>[355,356,358,361]</sup> Beide Verabreichungsarten werden schematisch in Abbildung 23B dargestellt.<sup>[361]</sup> Das **gezielte Editieren von Genen** scheint durch CRISP (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) möglich zu werden. Zusammen mit Cas9 (*CRISP-associated proteins*), eine Nuklease, die ortsgenau DNS schneidet, ist CRISP Teil des adaptiven Immunsystems von Bakterien und wurde 2012 erstmals von *Jinek et al.* beschrieben.<sup>[362]</sup> CRISP-CAS9-Plasmide werden dazu viral, nicht-viral, chemisch, physikalisch oder elektrisch in Zielzellen gebracht, um Mutationen zu korrigieren, ganze Gene zu ersetzen oder auszuschalten.<sup>[363,364]</sup> Die Methode ist dabei allerdings noch sehr neu und es bleibt abzuwarten, ob die gestellten Anforderungen erfüllt werden können und Risiken minimiert werden. In dieser Arbeit sollen Liganden untersucht werden, die als Transfektionsvektoren genkodierende DNS in Zellen transportieren. Daher werden im nachfolgenden Abschnitt der Transport von Nukleinsäuren in Zellen und die Transporthindernisse, die sich auf dem Weg ergeben können, beschrieben.

### 2.3.1. Transport und Transporthindernisse von Nukleinsäuren

Das nun folgende Unterkapitel widmet sich den Fragen warum und wie Nukleinsäuren transportiert werden und warum eigens dafür die Entwicklung von Transportern notwendig ist. Die grundlegende Beschreibung des Transfektionsprozesses (mit immer wiederkehrenden Bezug auf mögliche Hindernisse) soll daher bei der Klärung dieser Fragen helfen.

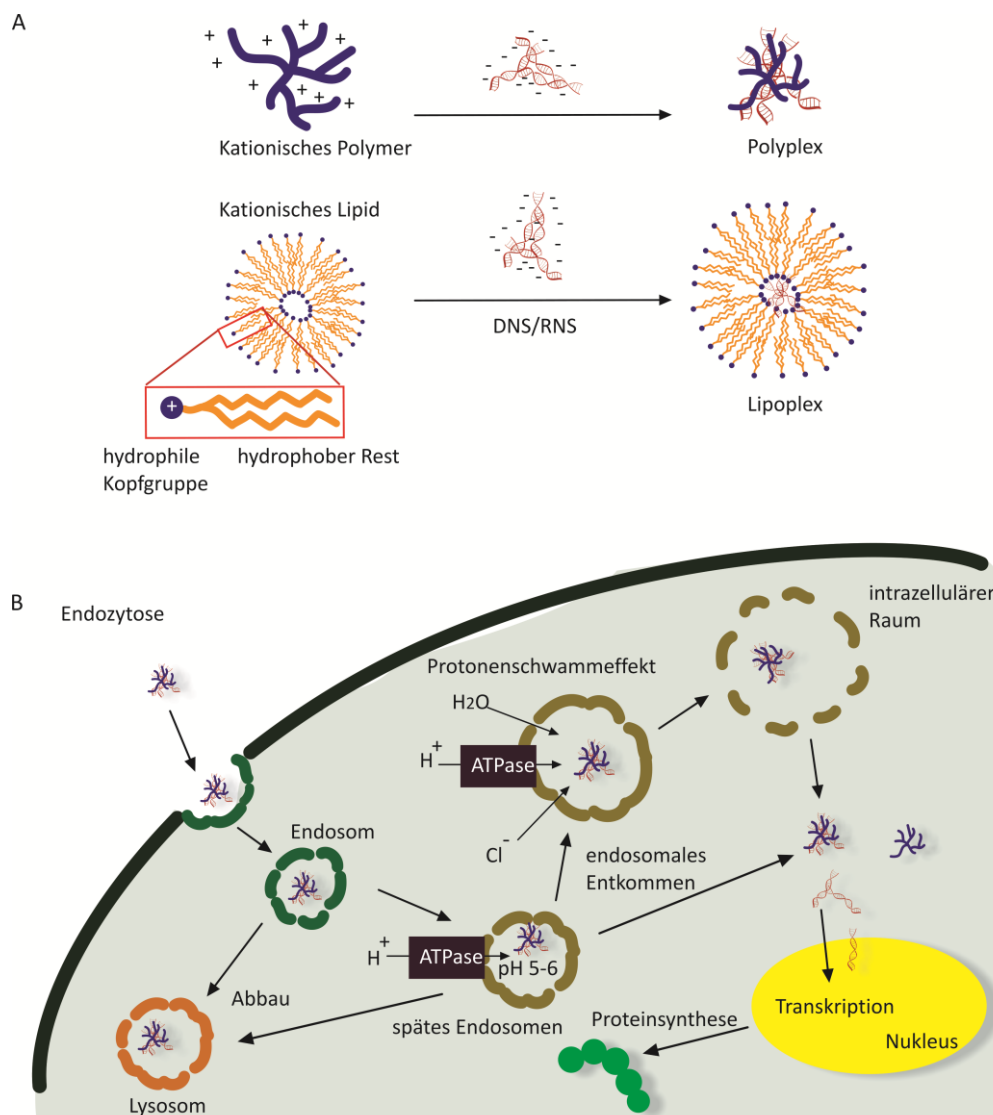
Der Weg, den die Nukleinsäuren von der Komplexbildung über die direkte Applikation ins Zellmedium oder in die Blutbahn bis hin in die Zelle (RNS) oder in den Nukleus (DNS) zurücklegen müssen, ist voller Hindernisse. In Abbildung 24 wird ein schematischer Überblick über die verschiedenen Transportschritte gegeben, die jeweils durchgeführt werden müssen und zu einer unüberwindbaren Hürde werden können.<sup>[365,366]</sup> Der Transfer von **nackter DNS** in Zellen ist dadurch limitiert, dass die DNS entweder die Zellmembran aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung nicht passieren kann oder schnell durch Nukleasen verstoffwechselt wird. Es gibt **physikalische Methoden**, wie Elektroporation, Sonoporation und Magnetofektion, die direkte Mikroinjektion in das Zielgewebe oder durch Verwendung einer *Gene Gun*. Diese Methoden können allerdings im hohen Maße zellschädigend sein, schlechte Transfektionseffizienzen aufweisen und somit für eine systemische Applikation ungeeignet sein.<sup>[358,366]</sup> Daher kommen im Allgemeinen **Genfähren** oder auch Transfektionsvektoren für den Nukleinsäuretransport zum Einsatz, wobei zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren unterschieden wird. Auf die Transfektionsvektoren,

insbesondere die nicht-viralen, wird im nachfolgenden Unterkapitel 2.3.2. weiter eingegangen. Neben hoher Transfektionseffizienz und Biokompatibilität, sollen die Vektoren keine Toxizitäten aufweisen und Immunantworten auslösen. Zudem sollen sie große Frachtmengen aufnehmen können und langfristig wirken. Die Herstellung sollte leicht und günstig sein.<sup>[361]</sup> Der eine Vektor, der alle Vorteile in sich vereint, ist bisher noch nicht gefunden worden. Waren effektive Verfahren zu unsicher, konnten sichere Verfahren keine guten Transfektionseffizienzen aufweisen. Daher ist es immer noch lohnenswert, Vektoren und ihre Eigenschaften zu erforschen, wie es auch Teil dieser Arbeit ist. Als therapeutische Nukleinsäuren werden sowohl genetisches Material, das mRNA (*messenger* RNS) kodiert wie pDNA und dsDNA, mRNA selbst, oder kurze Sequenzen, die komplementär zu der mRNA sind, verwendet. Zudem wird *small interfering* RNS (siRNA) als Fracht in Zellen eingeschleust, um Transkription oder Translation zu stören und so Gene stillzulegen.<sup>[358,361,367]</sup>

Im ersten Schritt muss also die genetische Fracht von dem Trägersystem, also dem Vektor, erkannt und gebunden werden. Aufgrund des anionischen Phosphatrückrats der DNA eignen sich für die Erkennung der DNA kationische Moleküle. Durch unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen können diese Moleküle mit der DNA Komplexe ausbilden und die DNA zu Nanopartikeln kondensieren. Dabei werden zwei größere Klassen von Nanopartikeln definiert. Polyplexe sind die Kondensate aus DNA bzw. RNA und kationischen Polymeren. Lipoplexe bilden sich, wenn DNA/RNA in kationische Lipide oder Liposomen aufgenommen wird. *Pector et al.* untersuchten die Bildung der kationischen Liposome mittels ITC und konnten so zwei Prozesse unterscheiden.<sup>[368]</sup> Der erste, schnelle exotherme Prozess ist auf die elektrostatische Interaktion der kationischen Lipide mit der negativ geladenen DNA zurückzuführen. Der zweite, langsamere endotherme Prozess beruht auf der Neuordnung der sich zusammenschließenden Strukturen.

Bei der Verabreichung in den Organismus ist der Vektor/DNA-Komplex den Bestandteilen des Blutes ausgesetzt, die beispielsweise eine Komplementaktivierung oder Aggregation der Erythrozyten bewirken könnten. Daher müssen die Transporter die Fracht bei systemischer Verabreichung schützen. Wichtig ist auch der Aspekt, gezielt Zellen zu adressieren, um einen therapeutischen Erfolg zu haben. D. h. die Genfrachten müssen zu ihren Zielzellen finden oder werden alternativ direkt in das Zielgewebe appliziert. Dort überwinden sie die Zellmembran, um in das Zellinnere zu gelangen. Die Aufnahme der nicht viralen Vektoren mit ihrer Genfracht kann über Phagozytose, Clathrin- und/oder Caveolae-abhängige Endozytose oder Mikropinozytose erfolgen.<sup>[369,370]</sup> Die **Endozytose** beschreibt generell die vesikuläre Aufnahme von Makromolekülen in Zellen und wird als der Hauptaufnahmeweg von nicht-viralen Vektoren angenommen. Dabei werden die Makromoleküle oder Molekülkomplexe entweder nach adsorptiver Anlagerung durch elektrostatische Wechselwirkung oder Rezeptor-vermittelt in membrangebundene Vesikel eingelagert, die sich – verallgemeinert – durch Einstülpung der Membran bilden. Bei der Mikropinozytose können größere gelöste Moleküle zwar unselektiv, aber reguliert und signalabhängig, aufgenommen werden, indem sich die Oberflächenmembran zu großen Vakuolen,

den Makropinosomen, einstülpt.<sup>[371]</sup> Ein Rezeptor-abhängiger Mechanismus beschreibt die Zusammenlagerung von Clathrinen nach Bindung der Genfrähe an Zellmembranrezeptoren, wodurch sich die Membran verformt und sich 100–150 nm große Gruben ausbilden. Daraus bilden sich dann die Endosomen.<sup>[372]</sup> Beim Caveolae-vermittelten Mechanismus erfolgt die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zelle durch flaschenförmige, 50–100 nm große Calveolen, deren Membran mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert ist und die sich auf der Zelloberfläche befinden. Partikel mit Größen von 20–40 nm können so effizient aufgenommen werden.<sup>[373]</sup> Die Vesikel lösen sich dann intrazellulär von der Membran ab und reifen zu späten Endosomen heran. Diese werden durch die ATPase-abhängige Protonenpumpe azidifiziert (pH 5–6), wodurch DNS-abbauende Nukleasen aktiviert werden können, und fusionieren letztlich zu Lysosomen. Vektor-Komplexe müssen also aus dem Endosomen freigesetzt werden, wenn eine Transfektion erfolgen soll, da sie ansonsten spätestens im Lysosom abgebaut würden.



**Abbildung 24.** A) Bildung von Polyplexen und Lipoplexen. B) Schematischer endozytischer Aufnahmemechanismus von Polyplexen. Das endosomale Entkommen der Genfracht kann über den Protonenschwammeffekt vermittelt werden.

Für einige Transfektionsvektoren stellt dieses **endosomale Entkommen** eine unüberwindliche Hürde dar.<sup>[374–377]</sup> Es wurden mehrere Strategien entwickelt, diese zu umgehen. Der **Protonenschwammeffekt** beschreibt die V-ATPase-vermittelte Anreicherung von Protonen im Endosomen durch die Pufferkapazität von Verbindungen mit funktionellen Gruppen, oft Amine, die niedrige  $pK_s$ -Werte aufweisen, wodurch der pH-Wert im Inneren des Endosoms herabgesetzt wird. Aufgrund von Elektroneutralität und Osmolarität strömen passiv Chlorid-Ionen und Wasser in das Endosominnere, was zuerst das Endosom anschwellen lässt und letztlich auseinander reißt.<sup>[378]</sup> Der Vektor/Gen-Komplex kann so ins Zytosol freigesetzt werden. Der Protonenschwammeffekt wurde erstmals im Zusammenhang mit Polyethylenimin (PEI) diskutiert.<sup>[379,380]</sup> Weiter erfolgen der Transport zum Nukleus, die Freisetzung der DNS aus dem Komplex und die Aufnahme in den Nukleus. Diese kann entweder über die Kernporen erfolgen, über eine Peptidsequenz – das *nuklear localisation signal* – oder passiv während der Zellteilung. Im Nukleus wird die DNS abschließend in mRNA transkribiert und nach eventueller posttranslationaler Modifikation kann zum Schluss das Protein gebildet werden.

### 2.3.2. Transfektionsvektoren

Als Transporter für den Gentransfer in Zellen dienen die schon im vorherigen Abschnitt erwähnten Transfektionsvektoren, die in virale<sup>[354,381,382]</sup> und nicht-virale Vektoren<sup>[366,383]</sup> unterschieden werden.<sup>[358]</sup> Das Hauptaugenmerk dieser kurzen Zusammenfassung liegt dabei auf den nicht-viralen Vektoren.

Soll langfristig die Expression des therapeutischen Gens gewährleistet werden, muss das Gen in die chromosomale DNS integriert werden. **Retroviren** verfügen über zwei wichtige Enzyme, die bei diesem Prozess unumgänglich sind. Die *Reverse Transkriptase* kann die virale RNS nicht nur in die jeweilige DNS umwandeln, sondern auch die entsprechende doppelsträngige DNS bilden. Diese virale dsDNS kann dann von der Integrase in das Genom der Zelle eingefügt werden. Um in die Zelle zu gelangen können Retroviren auf ein lange evolutionsoptimiertes, infektiöses Verhalten zurückgreifen. So bleibt das Material auch nach einer Zellteilung erhalten.<sup>[361]</sup> Da Retroviren aber auch potentielle Onkoviren sind, werden die Viren genetisch entschärft. Das bedeutet, dass ihnen die negativen viralen Gene, z. B. zur Replikation, entfernt werden. Diese replikationsdefekten Retroviren können dann nur noch das genetische Material in die Zellen einschleusen, sich selbst aber nicht weiter vermehren.<sup>[361]</sup> Trotzdem bleibt das Risiko, dass die Viren die Transgene in regulatorisch aktive Bereiche der DNS integrieren, was zu Insertionsmutagenesen oder -okogenese führen kann. Beispiele für verwendete Retroviren sind das zu den einfachen  $\gamma$ -Retroviren gehörende murine Leukämievirus (MLV), oder das Lentivirus, wozu das wohl bekannteste humane Immundefizienz-Virus (HIV) gehört. Lentiviren sind komplexer in ihrer genomischen Struktur als einfache Retroviren und haben den Vorteil Zellen infizieren zu können, die sich nicht in der Proliferationsphase befinden. Nicht onkogene Viren wie **Adenoviren**<sup>[384]</sup> oder **andeno-assoziierte**

**Viren** stellen eine interessante Alternative zu den Retroviren dar, obwohl sie die Transgene nicht in das Zellgenom integrieren können. In proliferierenden Zellen kommt es zu einem schnellen Verlust des Gens, wodurch die Expression zeitlich begrenzt ist. Zudem gelten die Adenoviren als immunogen und generell ist bei der Behandlung mit viralen Vektoren die langzeitliche Sicherheit nicht geklärt.<sup>[357,385]</sup> Dennoch werden in über 70 % der bisherigen klinischen Studien virale Vektoren<sup>[354]</sup> eingesetzt; nackte oder Plasmid-DNS werden zu 18 % angewendet, Lipofektion zu fast 6 %.<sup>[359,386]</sup> Allerdings, oder gerade weil die viralen Vektoren risikobehaftet sind, wurden nur einige wenige Vektorsysteme als Arzneimittel approbiert. **Gendicine®** (SiBiono), ein rekombinantes Adenovirussystem, das die Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 wieder herstellen soll, wurde 2003 in China als weltweit erstes Gentherapeutikum zur Behandlung von Kopf- und Hals-Karzinomen zugelassen.<sup>[387–389]</sup> Die Therapieeffizienz gilt als umstritten. Als zweiter modifizierter Adenovirus für dieses Krankheitsbild wurde Oncorine® 2005 ebenfalls auf dem chinesischen Markt eingeführt.<sup>[357]</sup> **Glybera®** (UniQure) wurde 2012 als erstes Gentherapeutikum von der EMA für den Gebrauch in der Europäischen Union zugelassen. Es handelt sich um einen adeno-assoziierten, viralen Vektor, der die codierende Sequenz der Lipoproteinlipase transfiziert. Durch Injektion in Muskelzellen kann dort die Expression des Enzyms gefördert werden, wodurch Pankreatitis-Schübe und die Lipoprotein-Lipase-Defizienz selbst abgemildert werden.<sup>[390–393]</sup> Für eine weitere Gentherapie mit einem onkolytischen Virus wurde **Imlygic®** (Amgen) 2015 von der EMA gegen Hautkrebs zugelassen. Das modifizierte Herpes-Simplex-1-Virus *Talimogen laherparepvec* fördert zum einen durch die Deletion der Gene ICP34.5 und ICP47 und zum anderen durch Insertion der kodierenden Sequenz des humanen Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors eine systemischen Immunantwort gegen die Tumorzellen.<sup>[394,395]</sup> Das *ex vivo*-Gentherapeutikum **Strimvelis™** (Glaxo-Smith-Kline) wurde 2016 von der EMA zur Behandlung des schweren Immundefekts infolge eines Adenosin-Desaminase-Mangels (ADA-SCID) – eine sehr seltene Krankheit – bei Kindern zugelassen. Dem Patienten werden dafür Knochenmarkproben entnommen, CD34+-Zellen, die Lymphozyten bilden können, extrahiert, das ADA-Gen mittels eines retroviralen Vektors transfiziert und die genetisch modifizierten Zellen dem Patienten intravenös wieder verabreicht. Strimvelis selbst ist dabei die autologe CD34+-angereicherte Zellfraktion, die retroviral mit der humanen ADA-cDNS-Sequenz transfiziert wurde.<sup>[396]</sup>

**Nicht virale Genfähren** umfassen eine Vielzahl von Verbindungsklassen, wie kationische Lipide und Polymere,<sup>[397]</sup> dendritische Polymere, Polymethacrylate oder Polysaccharide.<sup>[366,383,398–401]</sup> Eine aktuelle Übersicht wurde 2016 von Narain *et al.* herausgegeben.<sup>[366]</sup> Häufig handelt es sich also um relativ große Verbindungen, die über unspezifische elektrostatische und/oder andere nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, mit ihrer DNS/RNS-Fracht interagieren. Die Transfektionseffizienzen sind aufgrund der Transporthindernisse, die sich ihnen in den Weg stellen, insgesamt geringer als die der viralen Vektoren. Diese Hindernisse wurden bereits in Abschnitt 2.3.1. kurz vorgestellt. Allerdings können größere Frachten aufgenommen werden und nicht-virale Vektoren gelten zudem als die sichereren Vektoren, was Immunologie, Toxikologie und

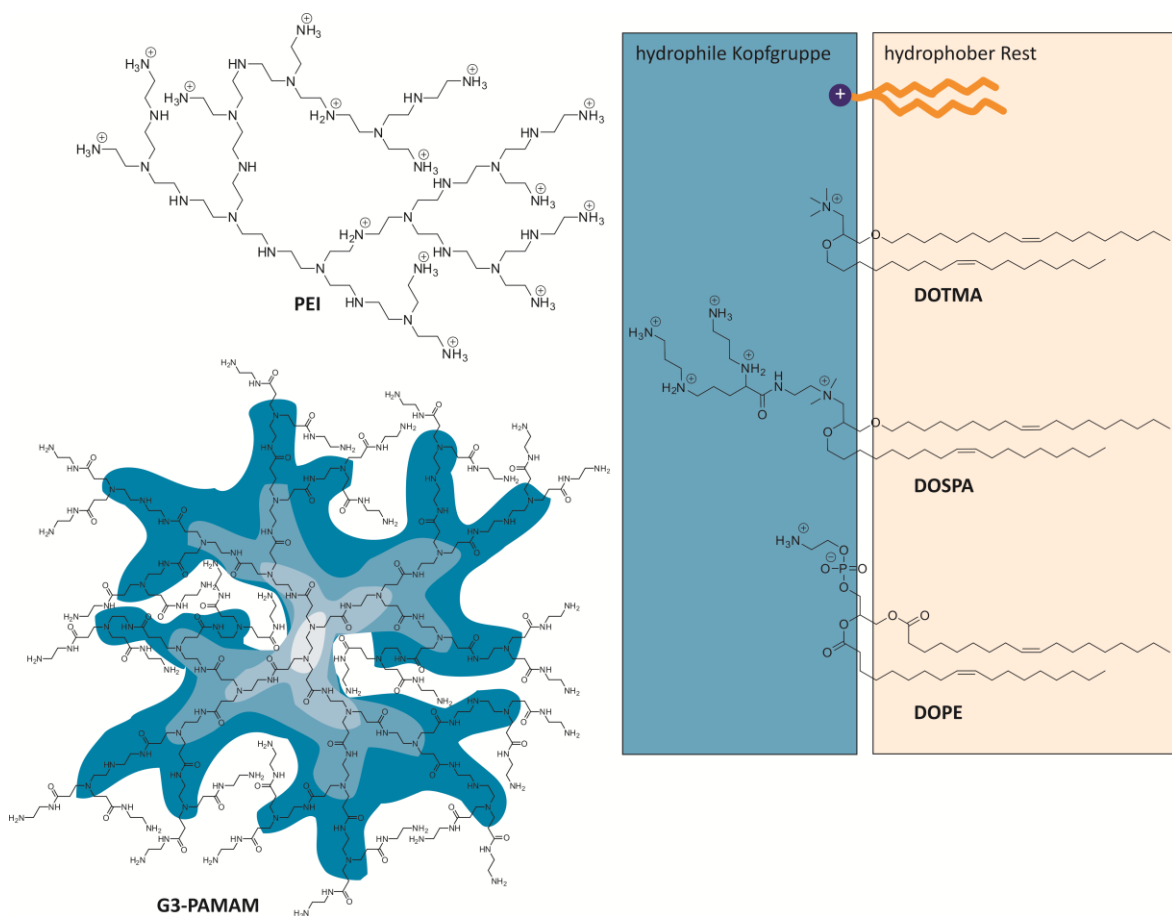
Onkologie betrifft.<sup>[383,402]</sup> Daher liegt ein großes Potential in der Entwicklung von sicheren, effizienten nicht-viralen Vektoren.

Eines der gängigsten kationischen Polymere, das oftmals als „Goldstandard“ unter den Transfektionsvektoren gilt, ist **Polyethylenimin (PEI)**.<sup>[380,383,403–405]</sup> Es finden sowohl Derivate unterschiedlichen Molekulargewichts als auch verzweigte und lineare Varianten Anwendung, wobei eine Transfektion in 18 humanen Zelllinien beobachtet werden konnte.<sup>[403]</sup> Die Polyplexe werden optimalerweise mit 5–25 kDa großen PEI Molekülen gebildet.<sup>[406–408]</sup> Wichtig für die generelle Bildung der Polyplexe ist das Verhältnis aus Polymer-Aminen und DNS-Phosphaten, das sogenannte N/P-Verhältnis, wobei typischerweise  $N/P > 1$  ist und mehrere DNS-Moleküle mit einem Polymermolekül wechselwirken. Faktoren, die die Größe der Polyplexe beeinflussen sind vielfältig. So spielen je nach Art und Molekulargewicht des verwendeten Vektors auch DNS-Konzentration, das N/P-Verhältnis, pH-Wert und das Puffersystem eine wichtige Rolle.<sup>[383]</sup> Daneben ist es insbesondere für *in vivo* Anwendungen wichtig, dass die Polyplexe nicht aggregieren. Die Ausbildung der Kondensate schützt die DNS zusätzlich vor Abbau, wobei die Bindung nicht zu stark sein darf, da sonst die DNS nicht wieder freigesetzt werden kann.<sup>[409]</sup> *Kunath et al.* konnten zudem zeigen, dass PEI mit geringerem Molekulargewicht DNS nur effektiv transfizieren kann, wenn höhere PEI-Amin/DNS-Phosphat-Verhältnisse eingesetzt werden.<sup>[410]</sup> PEI/DNS Komplexe mit Durchmessern von <500 nm werden über Clathrin- oder Calveolae-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen, während die Aufnahme von Komplexen >500 nm über Mikropinozytose erfolgt.<sup>[370]</sup> Die verzweigten Polymere weisen primäre, sekundäre und tertiäre Amino-Funktionen auf und sind somit über einen weiten pH-Bereich protonierbar.<sup>[403]</sup> Da bei physiologischem pH nur ca. 20 % der Amine protoniert vorliegen,<sup>[411]</sup> ist es bei PEI über den Protonenschwammeffekt möglich, die Endosomen zu verlassen.<sup>[380]</sup> Aufgrund seiner hohen Anzahl positiver Ladungen kann PEI zwar Transgene sehr gut kondensieren und so auch vor Nukleasen schützen, doch gleichzeitig weist es auch eine relativ hohe Zelltoxizität auf.<sup>[404,412]</sup> Größere PEI-Polymere neigen zudem dazu Aggregate zu bilden und sich an den Zelloberflächen anzulagern.<sup>[383]</sup> Im Gegensatz zu verzweigtem PEI weist lineares PEI keine tertiären Amine auf, was zu einer geringeren Ladungsdichte führt. Beispiele für lineare PEI-Derivate sind ExGen500<sup>[413]</sup> und jetPEI,<sup>[414]</sup> die ebenfalls kommerziell erhältlich sind. Ein anderes Polymer ist **Polyamidoamin (PAMAM)**.<sup>[415]</sup> Der Aufbau der sphärischen **Dendrimere** erfolgt über wiederholte Michael-Addition nukleophiler Ethylendiamine an Methylacrylat und so sind die Dendrimere an der äußeren Hülle mit Aminen funktionalisiert.<sup>[416]</sup> PAMAM kann mit DNS neutrale Komplexe bilden und durch seine hohe Pufferkapazität ebenfalls nach dem Protonenschwammmechanismus in der Zelle freigesetzt werden.<sup>[378]</sup> Allerdings kann es auch ein Loch mit 15–40 nm Durchmesser in der Zellmembran ausbilden, wodurch kleinere Komplexe unspezifisch über nicht-endozytotische Mechanismen in die Zelle gelangen können.<sup>[370]</sup> *Baker et al.* fanden heraus, dass zwar PAMAMs mit Generationen zwischen 5–10 beste Transfektionseffizienzen aufwiesen, dies aber auch abhängig von den verwendeten Zelllinien war.<sup>[417]</sup> *Samanta et al.* funktionalisierten die Amine eines G2-PAMAM-Dendrimers mit GCP-



Einheiten und konnten so erreichen, dass die Verbindung im nanomolaren Bereich erfolgreich als Genfahre fungiert, während nicht-funktionalisiertes G2-PAMAM unter gleichen Bedingungen keine transfizierenden Eigenschaften aufwies.<sup>[418]</sup>

**Kationische Lipide** wurden erstmal 1987 von *Felgner et al.* eingesetzt, die so den Begriff **Lipofektion** prägten.<sup>[419]</sup> Mittlerweile ist diese Klasse von nicht-viralen Vektoren etabliert und es gibt einige kommerziell (auch als Transfektions-Kit) erhältliche Verbindungen, wie DOTMA (Lipofectin), DOGS (Transfectam), DOPE oder auch Mischungen z. B. aus DOSPA und DOPE (Lipofectamin).<sup>[420–427]</sup> Der Aufbau kationischer Lipide besteht generell aus einer kationischen Kopfgruppe und hydrophoben Resten, meist (un)gesättigten Alkylketten (C12–C14) oder Cholesterolderivaten, die über eine Linkereinheit miteinander verknüpft sind. Die kationische Kopfgruppe kann dabei sowohl mono- als auch multivalent über elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Nukleotiden in Kontakt treten, wobei *Koynova et al.* zeigen konnten, dass polykationische Lipide DNS sowohl besser kondensieren als auch transfizieren konnten.<sup>[428]</sup> Typische Kopfgruppenfunktionalitäten sind Amino-, Guanidino- oder Imidazol-Einheiten, die auch Teil einer verknüpften Aminosäure sein können.<sup>[429–431]</sup> Die Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle erfolgt ebenfalls über einen Endozytosemechanismus, wobei dann die Membran der Endosomen durch Wechselwirkung der kationischen Lipide mit den Membranphospholipiden destabilisiert wird und einem Flip-Flop-Mechanismus folgend die Komplexe in der Zelle freigesetzt werden.<sup>[370,432]</sup>



**Abbildung 25.** Beispiele für kationische Polymere, Dendrimere und kationische Lipide.

**Zellpenetrierende Peptide (cell penetrating peptides, CPP)** bestehen aus 5 bis zu 40 Aminosäuren und zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, Zellmembranen durchqueren zu können, wobei sie gleichzeitig als Transporter für verschiedene Frachten dienen können. Zu den Frachten zählen neben DNS und RNS auch Proteine oder andere kleine Moleküle.<sup>[433]</sup> CPPs werden nach ihren enthaltenen Aminosäuren in kationische (TAT, Penetratin, R<sub>n</sub>, K<sub>n</sub>), amphiphile (Transportan, KW)<sup>[434]</sup> und hydrophobe (KFGF, C105Y)<sup>[435]</sup> Peptide unterteilt.<sup>[436]</sup> **Kationische CPPs** können nicht-kovalent über elektrostatische Wechselwirkungen DNS/RNS binden und kondensieren, wodurch allerdings meistens auch gleichzeitig die Aktivität der Peptide reduziert wird.<sup>[437]</sup> Die so gebildeten Partikel haben Größenordnungen im Nanometerbereich und sind in Summe positiv geladen, so dass eine Interaktion mit den membrangebundenen Proteoglykanen möglich ist.<sup>[436]</sup> Lineare **Poly-L-Lysine (PLL)** gehören zu den ersten nicht-viralen Vektoren, die untersucht wurden. 1975 konnten *Laemmli et al.* zeigen, dass PLL DNS kondensieren kann.<sup>[438]</sup> PLL sind einfach über Festphasenpeptidsynthese zugänglich und scheinen interessant, da die Verbindungen bioabbaubar sind. Sowohl Stabilität der PLL/DNS-Komplexe, als auch Größe und Transfektionseffizienz sind abhängig von der Länge der PLLs. *Kwoh et al.* legten hierfür eine Mindestlänge von 20 Lysineinheiten bzw. ein Molekulargewicht > 3kDa fest.<sup>[439]</sup> Kürzere PLLs, die z. B. nur 16 Lysine aufweisen, können DNS nur kondensieren und transfizieren, wenn sie mit mindestens zwei Cysteinen modifiziert wurden, um über Disulfidgruppen zu polymerisieren.<sup>[440]</sup> Ein weiterer Vorteil von Modifikationen der ε-Aminogruppen ist sicherlich die Einführung von Gruppen mit niedrigen pK<sub>s</sub>-Wert, wie Histidin, um so die Pufferkapazität der Verbindung zu erhöhen, da die Lysine unter physiologischem pH-Wert vollständig protoniert vorliegen.<sup>[441]</sup> Um die endosomale Freisetzung anders herbeizuführen, werden auch Co-Transfektionen mit Verbindungen wie Chloroquin durchgeführt, die aufgrund ihrer Pufferkapazität das endosomale Entkommen erleichtern.<sup>[375,442]</sup> Ein weiterer Nachteil von PLL ist eine hohe Toxizität, die mit der erhöhten positiven Ladungsdichte und Kettenlänge korreliert, wobei letzteres auf die Aktivierung des Komplementsystems zurückzuführen ist.<sup>[443]</sup> Die Toxizität kann daneben auch z. B. durch Einführung von Imidazoleinheiten reduziert werden<sup>[444]</sup> oder durch eine Verzweigung der Verbindung, so dass dendrische PLL anstelle linearer eingesetzt werden.<sup>[445]</sup> Abhängig von dem verwendeten Puffersystem neigen größere PLL/DNS-Komplexe zu Aggregation und Präzipitation.<sup>[446]</sup> In den späten 1980er Jahren identifizierten *Frankel* und *Pabo* eine Peptidsequenz des HIV-1 Virus, die von HL3T1 Zellen aufgenommen werden kann.<sup>[447]</sup> *Vivès et al.* konnten erst zehn Jahre später herausfinden, dass für die Translokation der zu den **Arginin-reichen CPPs** gehörende *trans-activator protein* (TAT)-Sequenz die Aminosäuresequenz YGRKKRRQRRR verantwortlich ist.<sup>[448]</sup> Anfang der 1990er Jahre wurde die 60 Aminosäuren umfassende Homeodomäne der *Antennapedia* gefunden, die ebenfalls biologische Membranen passieren kann. Die Zellaufnahme wird durch die deutlich kürzere Sequenz RQIKIYFQNRMRMKWKK, bekannt als Penetratin, vermittelt.<sup>[449]</sup> Der Aufnahmemechanismus der Arginin-reichen CPPs ist umstritten, so gibt es neben einem endozytotischen Mechanismus auch Hinweise auf eine direkte Translokation.<sup>[450]</sup>



Während die  $\epsilon$ -Amino-Gruppen des Lysins elektrostatische Wechselwirkung mit Anionen ausbilden kann, verfügt Arginin durch seine Guanidingruppe über die Möglichkeit zusätzlicher bidendater Wasserstoffbrückenbindungen. Polyarginine können daher mit DNS und RNS stärker interagieren und nur 6–8 Einheiten scheinen nötig zu sein, um mit DNS stabile Komplexe auszubilden. Nur 9 Einheiten werden benötigt, um den Komplex auch in Zellen zu transportieren. Polyarginine sind somit den entsprechenden Lysinderivaten überlegen.<sup>[437,451–457]</sup> *Koo et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht von Poly-L-Argininen und deren Transfektionseffizienz.<sup>[458]</sup> Dabei stellten die Forscher nicht nur fest, dass die Transfektionseffizienzen bei einem N/P-Verhältnis von 10 optimal und mit steigenden Molekulargewicht erhöht sind, sondern auch die Zelltoxizität zunimmt. Im Vergleich zu PLL können die Arginin-Verbindungen DNS stärker komplexieren und auch besser transfizieren. *Mann et al.* beobachteten das DNS-Kondensations- und Freisetzungvermögen von Lysin und Arginin Homopeptiden verschiedener Länge mittels Atomkraftmikroskopie parallel zu ihren Gentransportstudien.<sup>[459]</sup> Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die insgesamt effektiveren Arginin-Derivate vornehmlich multimolekulare Komplexe bilden und die DNS unabhängig von ihrer Länge komplett wieder freisetzen, während die Lysinderivate auch monomolekulare Komplexe bilden und die Freisetzung abhängig von ihrer Länge ist, was an dem unterschiedlichen Bindungsverhalten von Lysin und Arginin an DNS liegt. *Mitchell et al.* untersuchten Polymere bestehend aus sechs oder mehr Argininen, Lysinen, Ornithinen, Histidinen oder Citrullinen und konnten zeigen, dass die Arginin-Verbindungen effektiver in die Zellen eindringen konnten als die anderen untersuchten Verbindungen.<sup>[452]</sup> Die Mindestanzahl der Arginineinheiten konnte auf sechs festgelegt werden und zudem konnte die biologische Aktivität auf die Guanidingruppe zurückgeführt werden. Auch *Oba et al.* verglichen die Zellaufnahme und die Transportereigenschaften verschiedener Arginin-reicher CPPs.<sup>[460]</sup> Verbindungen mit R<sub>9</sub> wiesen dabei signifikant höhere Transfektionseffizienzen auf als (RRG)<sub>3</sub> und (RR-Aib)<sub>3</sub> mit jeweils nur sechs Argininen, wobei Aib die hydrophobe  $\alpha$ -Aminoisobutylsäure ist. Zudem konnten sowohl für das Glycin als auch für das Aib-Analogon eine verzögerte Transfektion festgestellt werden, die auf Stabilisierung durch hydrophobe Wechselwirkung und eine daraus resultierende verlangsamte Freisetzung der DNS aus den Komplexen zurückgeführt wurde. Die Forscher untersuchten weitere niedermolekulare CPPs, die entweder aus Lysin-, Arginin- oder  $\epsilon$ -Amin-modifizierten (aminoethyliert oder guanidinyliert) Lysin-Nonapeptiden aufgebaut waren. Dabei wiesen die Lys(GuaEt)-Peptid/pDNS-Komplexe höchste Transfektionseffizienzen (was auf das erhöhte endosomale Entkommen zurückgeführt wurde) und keine Zytotoxizität auf. Durch die TMR-markierten Moleküle konnte gleichzeitig die intrazelluläre Verteilung beobachtet werden. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass TMR-G-(K-GuaEt)<sub>9</sub> bei geringeren Konzentrationen in die Zellen aufgenommen werden, als die entsprechenden TMR-G-R<sub>9</sub> Peptide.<sup>[461]</sup> *Li et al.* verglichen in einer Studie Homotetrapeptide bestehend aus Arginin und Lysin mit einem an der  $\epsilon$ -Aminofunktion GCP-modifizierten K<sub>4</sub>-Peptid (**35**) und konnten so zeigen, dass auch kleinere Moleküle effektive

Transfektionsvektoren sind, wenn starke, maßgeschneiderte Anionen-Erkennungseinheiten, wie GCP, verwendet werden.<sup>[462]</sup> (K-GCP)<sub>4</sub> (**35**) ist der kleinste bisher veröffentlichte Transfektionsvektor. Das thermodynamische Profil der untersuchten Verbindungen veränderte sich durch die Erhöhung der Anzahl der GCP-Einheiten von entropisch zu enthalpisch begünstigt, was auf eine spezifischere Bindung hindeutet.<sup>[463]</sup> Die Studien zeigen eindrucksvoll, dass durch gezieltere Wechselwirkung die Eigenschaften der Verbindungen verbessert werden können. Dieses Prinzip soll durch die Verwendung des GCP-Bindungsmotivs auch auf die in dieser Arbeit entwickelten multivalenten Liganden übertragen werden.

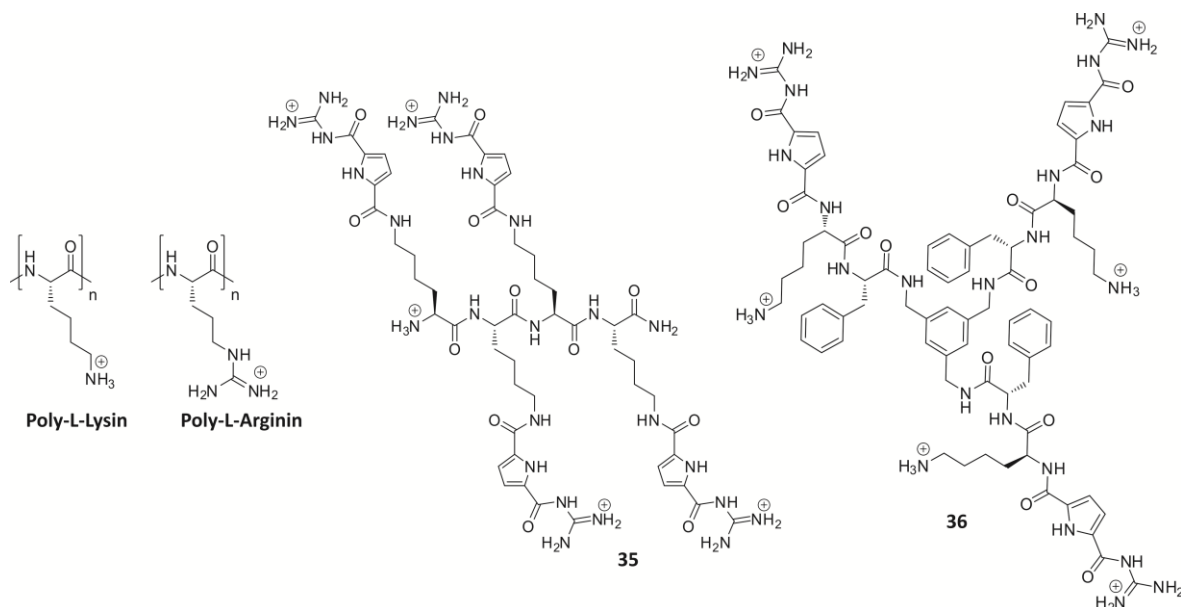


Abbildung 26. Strukturen einiger CPPs.

Der dreiarmlige Ligand **36** von *Kuchelmeister et al.* weist über einen (Triaminomethyl)benzol-Kern verknüpfte peptidische Seitenketten auf, die terminale GCP-Einheiten tragen.<sup>[464]</sup> Die Verbindung bindet DNS im mikromolaren Bereich (ITC, EB) und transfiziert diese mit Effizienzen vergleichbar mit PEI. Zudem bestätigen AFM- und DLS- Studien die Bildung dicht gepackter Aggregate. In Anwesenheit von Chloroquin konnten fast doppelt so hohe Transfektionseffizienzen erzielt werden.<sup>[465]</sup> Ausgehend von einer anlogen, jedoch transfektionsineffizienten zweiarmligen Verbindung, entwickelte *Kuchelmeister* eine kombinatorische Bibliothek. Die Verbindungen wiesen bessere DNS-Bindungseigenschaften im nanomolaren Bereich auf, allerdings konnte immer noch keine Transfektion festgestellt werden. Erst durch eine zusätzliche Modifikation mit lipophilen Resten wurde dies ermöglicht. *Junghänel et al.* untersuchte den Transfektionsmechanismus der GCP-modifizierten, auf **36** basierenden Verbindungen.<sup>[466]</sup> Dabei wurden einzelne Hindernisse des Nukleinsäuretransports genauer analysiert. Die erfolgreiche endosomale Aufnahme und Einkapselung konnte mittels Co-Lokalisationsexperimenten nachgewiesen werden. Durch Co-Transfektion mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin konnte bestätigt werden, dass die Freisetzung aus dem Endosomen säureabhängig ist (Protonenschwammeffekt) und GCP deutlichen Einfluss auf die Pufferkapazität der Verbindungen nimmt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Einbindung der

GCP-Einheit in die Liganden die komplexierte DNS vor Abbau durch Nukleasen im Zytosol schützen kann. Die Verwendung der GCP-tragenden Liganden zur Gentransfektion stellt eine Weiterentwicklung der in Kapitel 2.1. beschriebenen Verbindungen zur molekularen Erkennung von einfacher Nukleotide und komplexer DNS dar. Durch diese Studien wurde erst der Entwurf der in dieser Arbeit verwendeten multivalenten Liganden definiert.

Generell stellen **Modifikationen** eine vielfältig angewandte Methode dar, um bestehende Vektor-Systeme zu verbessern und die verschiedenen Hindernisse des Nukleinsäuretransports besser zu meistern.<sup>[365,467]</sup> Viele polykationische Vektoren weisen aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte erhöhte Toxizitäten auf. Neben einer Anpassung des N/P-Verhältnisses kann durch Verwendung verzweigter, strukturell flexibler Verbindungen die Toxizität herabgesenkt werden. Zudem zeigen solche Verbindungen meist auch höhere Transfektionseffizienzen verglichen mit starren Analoga. Guanidinylierung ist ebenfalls geeignet, um die Transfektion zu steigern.<sup>[365]</sup> Extrazellulär gilt es, den Abbau durch Nukleasen und unerwünschte Wechselwirkung mit Proteinen zu vermeiden, indem die Vektoren z. B. durch **PEGylierung** oder Konjugation mit anderen hydrophilen, ungeladenen Polymeren getarnt werden.<sup>[365,468–470]</sup> Ogris *et al.* konnten zeigen, dass für die *in vivo*-Anwendung von DNS/Transferrin-PEI-Komplexen nach Kupplung mit PEG die Erythrozytenaggregation und Bindung mit Plasmaproteinen verringert war.<sup>[471]</sup> Zudem waren die Komplexe stabiler, konnten länger im Blut zirkulieren und die Toxizität konnte signifikant gesenkt werden. Die Erkennung von **Zielzellen**, z. B. Tumorzellen oder Leberzellen, kann durch **Targeting** erreicht werden, indem die Vektoren mit Antikörpern, Kohlenhydraten, Wachstumsfaktoren, Integrinen, etc., dekoriert werden, deren entsprechenden Rezeptoren in der Zellmembran wirksam werden.<sup>[472–475]</sup> Ping *et al.* konnten in einem tumortragenden Mäusemodell zeigen, dass nach systemischer Injektion ihr FGFR-adressierendes Vektorsystem gezielt in Tumorzellen eindringt.<sup>[476]</sup> Eine Konjugation mit Folsäure und Transferrin konnte ebenfalls erfolgreich für den Gentransfer in Tumorzellen angewendet werden.<sup>[471,477–479]</sup> An der Zielzelle angelangt, stellt die **Zellmembran** eine physikalische Barriere für die Vektoren dar. Diese kann durch Verknüpfung mit CPPs überwunden werden.<sup>[457,480,481]</sup> Eine Hydrophobisierung der Vektoren kann die Wechselwirkung mit Zellmembranen erhöhen. Dafür werden lange Alkylketten, hydrophobe Aminosäuren, Cholesterol und andere steroidale Reste eingesetzt.<sup>[383,482–484]</sup> Intrazellulär ist die **endosomale Freisetzung** eine weitere Hürde für viele Transfektionsvektoren. Durch pH-sensitive Einheiten, wie Histidin, oder synthetischen EEDs (*endosomal escape domains*), kann die Pufferkapazität der Vektoren erhöht oder die endosomale Membran destabilisiert werden.<sup>[375,485–487]</sup> Der Transport des Transgens zum Nukleus und die **nukleäre Aufnahme** können durch die Verknüpfung mit bestimmten Peptidsequenzen, den NLS (*nuklear localization signals*), gesteuert werden.<sup>[488,489]</sup> Damit nach Freisetzung der Fracht die (toxischen) Vektoren nicht in der Zelle akkumulieren, ist die **Bioabbaubarkeit** ebenfalls eine wünschenswerte Eigenschaft der nicht-viralen Vektoren. Dies kann z. B. durch Einbau von Disulfidbrücken, Ester- oder Amidfunktionen und redoxlabilen Einheiten erreicht werden.<sup>[490]</sup>

Die Gentransfektion ist mittlerweile ihren Kinderschuhen entwachsen. Doch der eine Vektor, der Sicherheit und Effizienz in sich vereint, bleibt nach wie vor ein Wunschgedanke. Nicht-virale Genfähren, die als sicher gelten, müssen sich der Herausforderung stellen, das genetische Material effizient in Zellen zu transportieren und dabei die Transporthindernisse erfolgreich zu meistern. In den letzten Jahren standen Hybride aller Art im Fokus der Forscher für die Entwicklung intelligenter, synthetischer Vektorsysteme.<sup>[491–493]</sup> Doch auch die genaue Betrachtung der Wechselwirkungen einzelner Vektorkomponenten (z. B. mit DNS, Zellmembranen oder anderen Zellbestandteilen) und die Verwendung künstlicher Bindungsmotive, wie dem GCP-Baustein, scheinen ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung der Genfähren.

### 3. Zielsetzung

---

Die Untersuchung peptidischer, multivalenter Liganden zur Beeinflussung biochemischer Prozesse steht im Fokus dieser Arbeit. Über molekulare Erkennungsprozesse sollen die biologischen Zielstrukturen supramolekular adressiert werden. Die Kombination der multivalenten Liganden mit maßgeschneiderten Anionen-Erkennungsmotiven, wie dem GCP, soll den Erkennungsprozess einträglich unterstützen. Als konkrete Ziele wurden zum einen die Protein-Protein-Interaktion zwischen 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF sowie 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein und zum anderen DNS gewählt. Demnach gliedert sich die Arbeit in drei Teilprojekte.

Das **erste Projekt** befasst sich mit der Entwicklung und Darstellung multivalenter Liganden. Die Synthese der Liganden, soll einfach und modular sein. Über die Verknüpfung von Lysin-Einheiten lässt sich ein dendritisches Grundgerüst konstruieren, über das eine variable Anzahl von Seitenarmen eingeführt werden kann. Als Leitstruktur für die Seitenarme wurde eine Kombination aus kationischen und hydrophoben Aminosäuren gewählt. *Wich* und *Kuchelmeister* konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass diese Zusammenstellung vielversprechend sowohl für die Bindung an Proteinoberflächen als auch an DNS ist.<sup>[32,465]</sup> Aminosäuren bilden somit die Basis der Liganden, wodurch auf ein von der Natur geschaffenes Baukastenkonzept für die molekulare Erkennung mittels nicht-kovalenter Wechselwirkung zurückgegriffen werden kann. Kationische Aminosäuren wie Lysin oder Arginin können über ihre Seitenketten ionische Wechselwirkungen ausüben oder Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Diese Aminosäuren interagieren im Speziellen mit den Carboxylatseitenketten der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure, sowie mit

Phosphatgruppen. GCP, als künstliches Anionen-Bindungsmotiv, soll hierfür ebenfalls Anwendung finden. Hydrophobe Aminosäuren, wie Phenylalanin oder Tryptophan, können hydrophobe- oder  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen vermitteln. Die Grundsequenz der Seitenarme bildet die Abfolge aus Glycin, Lysin, Phenylalanin und GCP. Der Glycin-Baustein ist allen Liganden gemein und dient als Linker zwischen Grundgerüst und Seitenarm. Das Designkonzept ist in Abbildung 27 dargestellt.

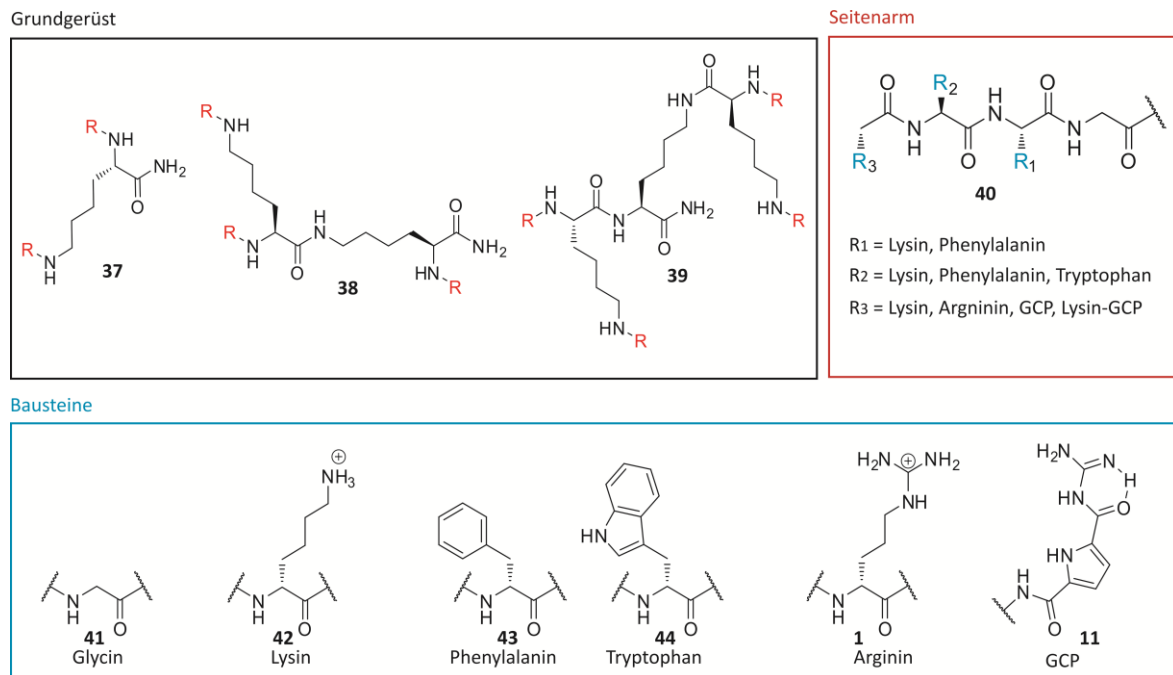


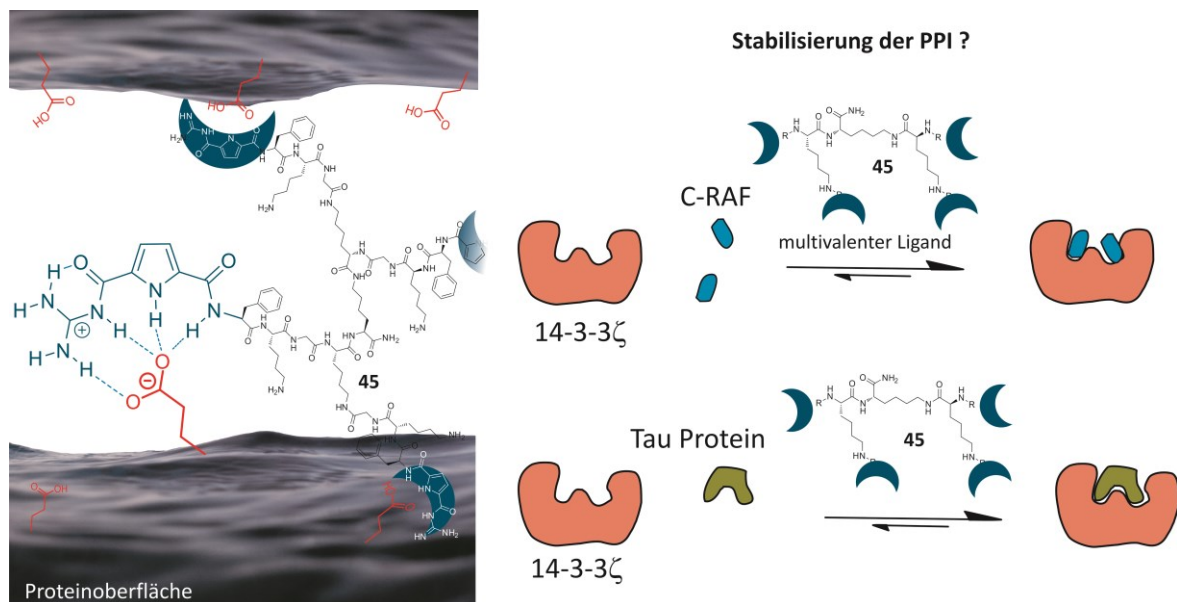
Abbildung 27. Aufbau der multivalenten Liganden.

Mit Hilfe der multivalenten Liganden lassen sich somit folgende Kern-Fragestellungen untersuchen:

- Welchen Einfluss nimmt die Bindigkeit der multivalenten Liganden?
- Kann GCP gewinnbringend in den Erkennungsprozess mit einbezogen werden? Welchen Einfluss nimmt GCP darüber hinaus?

Im **zweiten Projekt** sollen die multivalenten Liganden durch Bindung an die Proteinoberflächen die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\zeta$  und zweier seiner Partnerproteine (C-RAF und Tau Protein) stabilisieren. PPI über Stabilisierung zu modulieren ist eine Strategie, die selten verfolgt wird und somit auch wenig erforscht ist. Stabilisierung, sowohl allosterisch als auch orthosterisch, ist ein komplexer Vorgang, bei dem ternäre Komplexe gebildet und untersucht werden müssen. Obwohl in der Literatur mehrheitlich niedermolekulare Verbindungen als PPI-Modulatoren beschrieben werden, ist die Verwendung größerer Verbindungen dennoch nicht abwegig, da (mehrere) Regionen auf (mehreren) Proteinen adressiert werden müssen, um – neben dem Ziel die Interaktion

zu stabilisieren – hohe Bindungsaffinitäten als auch Selektivität zu erhalten. Einige PPI-Inhibitoren, die in klinischen Studien getestet werden, haben Molekulargewichte deutlich über  $500 \text{ g mol}^{-1}$  und weisen Bindungsaffinitäten von  $< 1 \text{ } \mu\text{mol}$  auf.<sup>[51]</sup> Daher erwarten wir mit den hier vorgestellten, durch GCP-modifizierten, multivalenten Liganden eine geeignete Verbindungsklasse zu identifizieren, diese Herausforderung meistern zu können.

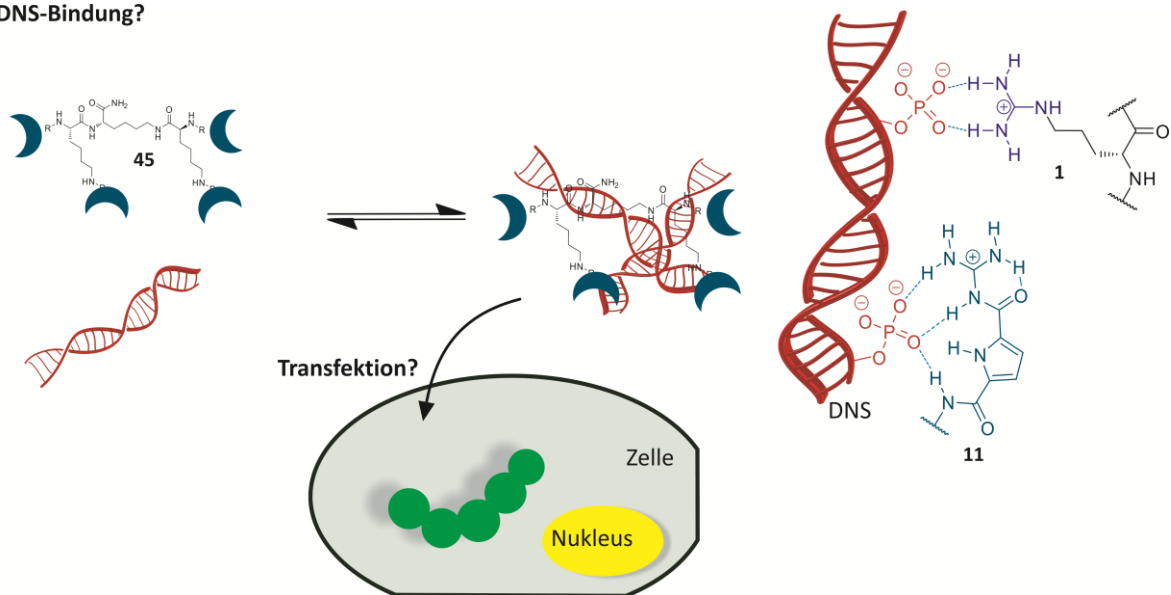


**Abbildung 28.** Übersicht **Projekt 2:** Stabilisierung von 14-3-3ζ-Wechselwirkungen mit multivalenten Liganden. Die stabilisierende Wirkung der Liganden soll mittels der GCP-Einheit verbessert werden.

Das **dritte Projekt** umfasst die Bindung von DNS und den Einsatz der multivalenten Liganden als Transfektionsvektoren. Polykationische CPPs finden weit verbreitet Anwendung als Transfektionsvektoren. Die Bindung der anionischen DNS basiert dabei auf (eher unspezifischen) elektrostatische Wechselwirkungen und eine Mindestanzahl von sechs Arginin-Einheiten scheint hierfür nötig zu sein; für die Transfektion sogar acht. Darüber hinaus nehmen sowohl Anordnung der positiv geladenen Reste als auch Hydrophobizität der Verbindungen Einfluss auf die Transfektion.<sup>[437,451,455]</sup> Verschiedene symmetrische, multivalente Liganden von *Kuchelmeister*<sup>[465]</sup> und *Junghänel*<sup>[466]</sup> zeigen ein hohes Potential, Nukleinsäuren zu binden und in Zellen einzubringen. Durch Einbinden der GCP-Einheit konnte höhere Transfektionseffizienzen, durch verbesserte DNS-Bindung, erhöhte Pufferkapazität und Abschirmung vor Abbau in den Zellen, erzielt werden. *Li* konnte mit  $(\text{K-GCP})_4$  (**35**) zudem den bisher kleinsten Transfektiosvektor vorstellen.<sup>[462,463]</sup> Für das Design der Vektoren scheint es wichtig, eine geeignete Balance zwischen DNS-Bindung/-Kondensation und Wiederfreisetzung zu finden, wodurch die Untersuchung der Zusammensetzung und des Aufbaus der Verbindungen hier ein guter Ansatzpunkt ist. Mit den hier vorgestellten

multivalenten Liganden kann so in einem weiteren Anwendungsgebiet diese Verbindungsklasse getestet werden.

#### DNS-Bindung?



**Abbildung 29.** Übersicht **Projekt 3:** Verwendung der multivalenten Liganden als Transfektionsvektoren.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

---

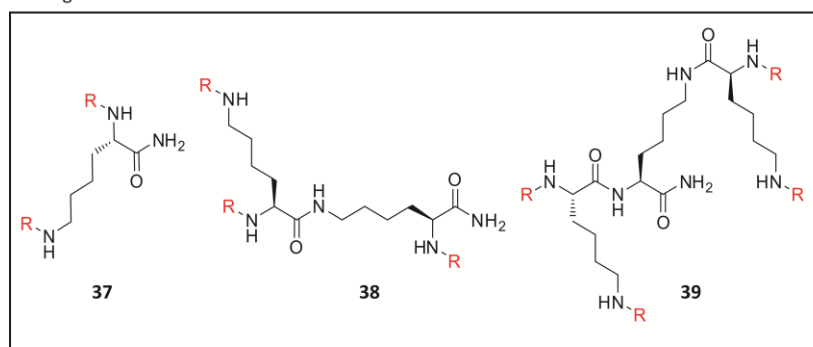
Im Fokus dieser Dissertation steht die Entwicklung und Untersuchung multivalenter Liganden, die zum einen Protein-Protein-Interaktionen modulieren sollen und zum anderen als Genfährern eingesetzt werden. Dafür müssen biologische Zielstrukturen, wie eine Proteinoberfläche oder DNS, über molekulare Erkennungsprozesse adressiert werden. Dies soll durch Verwendung supramolekularer Liganden geschehen. Es soll zudem nachgewiesen werden, dass durch Kombination von Multivalenz und dem künstlichen Anionen-Erkennungsmotiv GCP diese Erkennungsprozesse maßgeblich unterstützt werden können.

### 4.1. Synthese der multivalenten Liganden

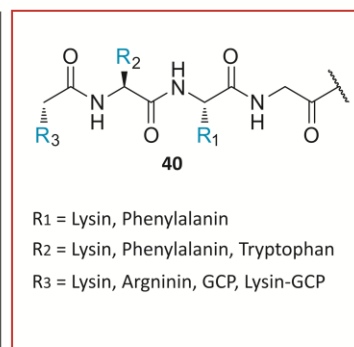
Im Folgenden wird die Entwicklung und Synthese der in dieser Arbeit verwendeten, multivalenten Liganden beschrieben, die dendritisch aufgebaute, polykationische Peptide sind. Durch die Verwendung eines dem Baukastenprinzip folgenden Aufbauschemas, das als Grundgerüst ein Lysin-Dendrimer und als Seitenarme eine Sequenz verschiedener Aminosäuren verwendet, sind die Liganden auf einfache aber effektive Weise zugänglich. Als zusätzlicher Baustein findet das künstliche Anionen-Bindungsmotiv GCP Anwendung. Alle Bausteine, inklusive der GCP-Einheit, lassen sich über Festphasenpeptidsynthese miteinander verknüpfen und die Liganden sind so „an einem Stück“ herstellbar. *Wich* und *Kuchelmeister* konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass eine Zusammenstellung aus hydrophoben und kationischen Aminosäuren vielversprechend sowohl für die Bindung an Proteinoberflächen als auch an DNS ist.<sup>[32,465]</sup> Daher umfasst der hier eingesetzte Baukasten (siehe Abbildung 30) die Aminosäuren Glycin, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin, Arginin und das künstliche GCP.

Die Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) wurde 1963 von *R. B. Merrifield* als Standardmethode zur Herstellung von Polypeptiden etabliert.<sup>[494–498]</sup> Das Peptid wird dabei über einen Linker, die Sollbruchstelle, an einem Harz (meist bestehend aus querverknüpften Polystyrolen oder Polyamide mit einem Durchmesser von ca. 50 µm) aufgebaut. Die Methode besteht dadurch, dass die mit bloßem Auge sichtbaren Harzkugeln durch einen feinporösen Keramikfilter im Kolben zurückgehalten werden, während alle löslichen Reagenzien einfach gewaschen werden können. Der Aufbau des Peptids erfolgt dabei vom C- zum N-Terminus, wobei für die Synthese orthogonal geschützte Aminosäuren wichtig sind. Der N-Terminus wird durch das basenlabile *Fmoc* geschützt und um Nebenreaktionen zu unterdrücken, sind die Seitenketten der Aminosäuren mit einem säurelabilen (*Boc*- oder *Pbf*-),<sup>[499,500]</sup> hydrogenolysierbaren (*Cbz*-) oder metallkatalytisch abspaltbaren [Allyloxycarbonyl (*Alloc*)]<sup>[501,502]</sup>-Rest verknüpft. Das gewünschte Peptid kann so schrittweise aufgebaut werden, ohne aufwendige zwischenzeitliche Isolations- und Reinigungsschritte zwischendurch.<sup>[495]</sup>

Grundgerüst



Seitenarm



Bausteine

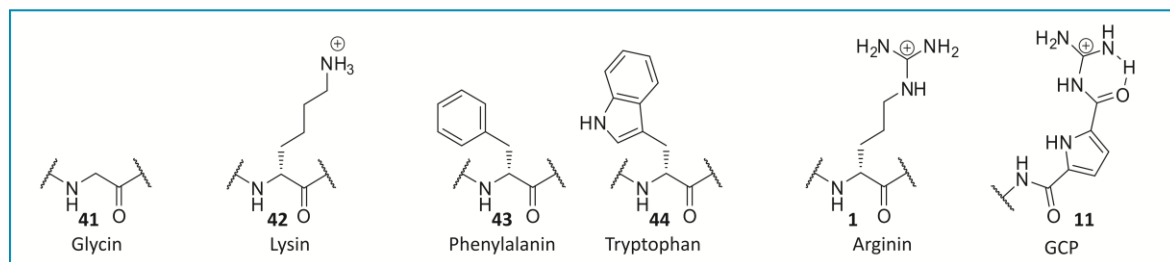


Abbildung 30. Baukasten für die Ligandensynthese.

Das für diese Arbeit fundamental wichtige Oxo-Anionen-Bindungsmotiv GCP wurde ursprünglich von *Schmuck* Anfang der 2000er Jahre entwickelt. Die Synthese dieses Bindungsmotivs ist daher in der *Schmuckschen* Arbeitsgruppe etabliert und soll im Folgenden nur kurz vorgestellt werden (s. Abbildung 31). Grundbaustein ist kommerziell erhältliches Pyrrol (**46**), das im ersten Syntheseschritt mit Trichloracetylchlorid zu Trichloracetylpyrrol (**47**) umgesetzt wird. In einer Haloform-Reaktion wird das Trichloracetylpyrrol mit frisch hergestellten Natriumbenzylalkoholat verestert (**48**). Durch das tropfenweise Zufügen von Phosphorylchlorid zu DMF wird dann *in situ* das Vilsmeier-Haak-Reagenz, ein Elektrophil, hergestellt, welches dann die Formylierungs-Reaktion eingeht. Das Pyrrol-Aldehyd **49** wird im folgenden Schritt mit Kaliumpermanganat oxidiert und die

entstandene Säure (**50**) mit *N*-Boc-Guanidin (**53**) gekuppelt. Im letzten Schritt wird der Benzylester (**54**) mit Palladium auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre hydrogenolytisch gespalten. Das Boc-geschützte GCP (**55**) kann nun als Baustein in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden.

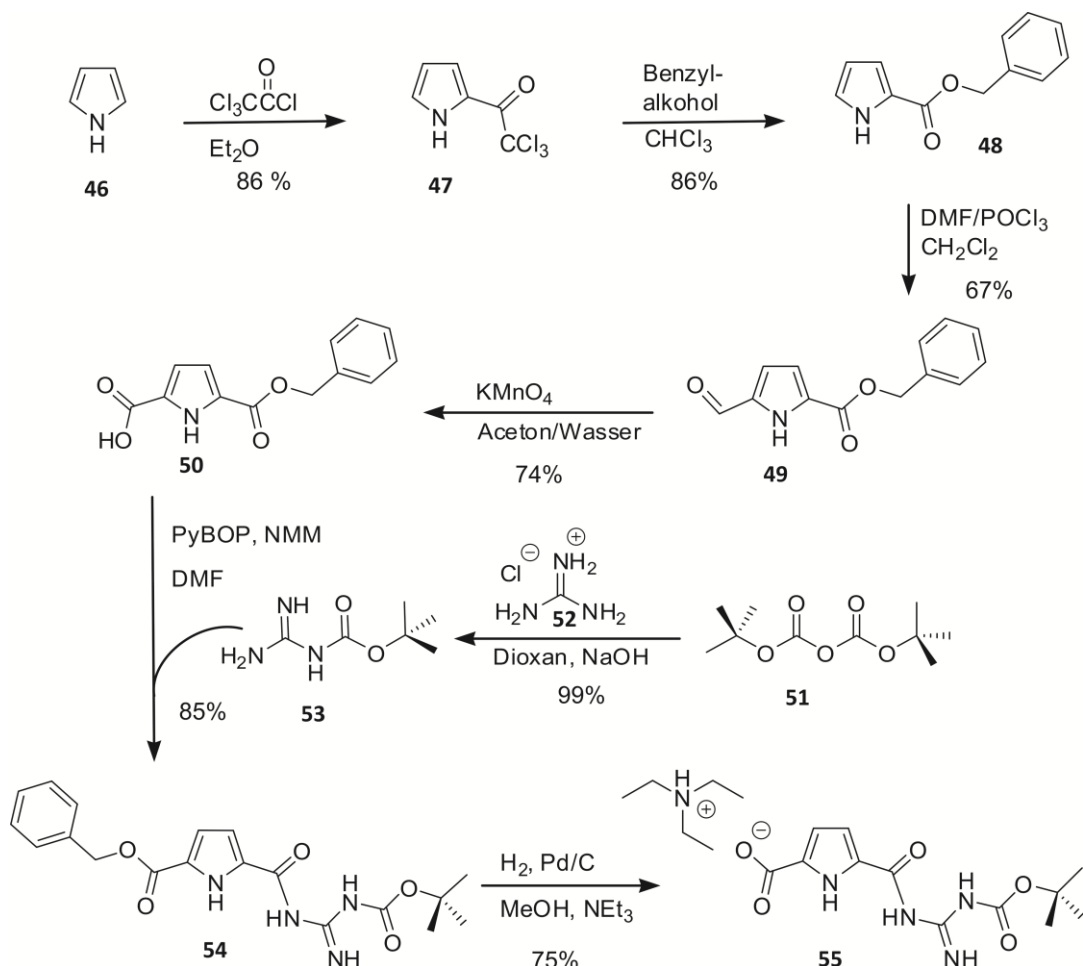
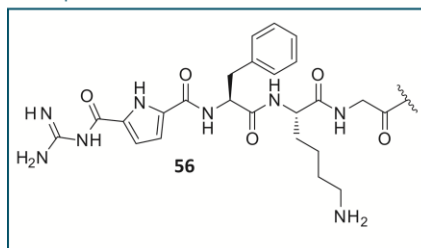


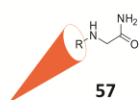
Abbildung 31. Synthese des GCP-Bausteins.

Für die Untersuchung der multivalenten Liganden als Modulatoren von Protein-Protein-Interaktionen soll die Wechselwirkung des 14-3-3 $\zeta$ -Proteins mit C-RAF sowie mit Tau Protein als Ziel dienen. Der Verwendung polykationischer Liganden scheint hier sinnvoll zu sein, da die Oberfläche des 14-3-3 $\zeta$ -Proteins zahlreiche Asparagin- und Glutaminsäure-Einheiten aufweist, die durch die kationischen Aminosäuren und das Anionen-Bindungsmotiv gut adressabel sind. Als erste Leitsequenz für die multivalenten Liganden wurde eine Abfolge aus Glycin, Lysin, Phenylalanin und GCP festgelegt. Durch die Verwendung der verschiedenen dendritischen Grundgerüste entstand so eine Serie aus vier Liganden, die unterschiedliche Bindungs-Multivalenzen aufweisen (Abbildung 32).

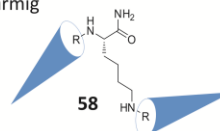
Leitsequenz 1



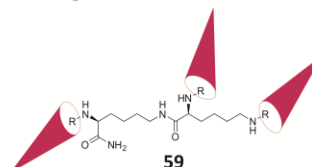
ein-armig



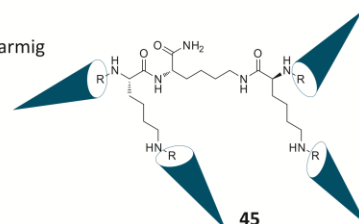
zwei-armig



drei-armig

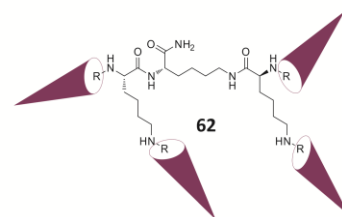
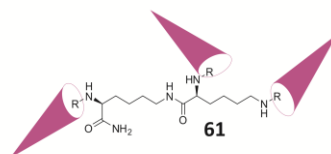
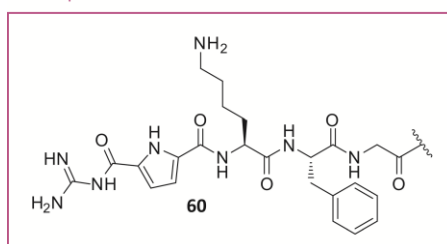


vier-armig

**Abbildung 32.** Serie multivalenter Liganden, die die Leitsequenz 1 aufweisen.

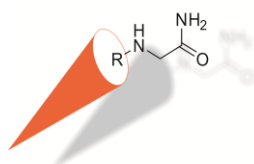
Für die Untersuchungen zu DNS-Bindung und Gentransfektion wurde der Aufbau zunächst leicht verändert. Verschiedene symmetrische, multivalente Liganden von *Kuchelmeister*<sup>[465]</sup> und *Junghänge*<sup>[466]</sup> zeigen ein hohes Potential Nukleinsäuren zu binden und in Zellen einzubringen. Daher leitet sich die Leitsequenz hier direkt von diesen dreiarmigen Vektoren ab und umfasst die Abfolge aus Glycin, Phenylalanin, Lysin und GCP (im Vergleich zu den oben beschriebenen Liganden ist die Reihenfolge von Phenylalanin und Lysin vertauscht; Abbildung 33). Dadurch wird nicht nur eine direkte Vergleichbarkeit mit den bisherigen Studien möglich, sondern durch die Verwendung des anderen Grundgerüsts wird auch die Untersuchung vierarmiger Systeme zugänglich.

Leitsequenz 2

**Abbildung 33.** Die Leitsequenz 2 tragenden Liganden 61 und 62.

Nachfolgend werden systematisch die Synthesen der einzelnen Liganden beschrieben.

#### 4.1.1. Einarmiger Ligand



Die Synthese des kleinsten, einarmigen Liganden erfolgte, wie in Abbildung 34 dargestellt, auf fester Phase unter Verwendung von *Rink Amid MBHA* Harz.<sup>[503]</sup> Zu Beginn der Synthese lässt man das Harz in DCM quellen, um die verknäulten Seitenketten mit den Linkern nach außen zu stülpen und somit für die Synthese zugänglich zu machen. Der Linker ist im Falle des *Rink Amid MBHA* Harzes mit Amino-Gruppen funktionalisiert. Diese müssen zunächst von ihrer Fmoc-Schutzgruppe befreit werden, was unter basischen Bedingungen (20 % Piperidin in DMF) erfolgte. Die Freisetzung des Amins wurde mit dem Kaiser-Test detektiert. Die Carboxylgruppe der ersten Aminosäure Fmoc-Glycin-OH wurde unter Zuhilfenahme des

Kupplungsreagenzes PyBOP<sup>[504]</sup> und der Hilfsbase DIPEA in den Aktivester überführt und nachfolgend mit der freien Amino-Gruppe an das Harz gekuppelt. Die Kupplung erfolgte dabei stets unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur. Der modifizierte *Schlenck*-Kolben wurde während der Kupplung moderat für mindestens 4 Stunden auf einem Orbitalschüttler geschwenkt. Diese Prozedur wurde zweifach durchgeführt, um die Umsetzung zu vervollständigen, was durch einen negativen Kaiser-Test auch angezeigt wurde; die Harzkügelchen schienen durchsichtig klar anstelle von tief violett. Der Zyklus aus Fmoc-Entschützung und Peptidbildung wurde so lange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz aufgebaut war. Die Tripeptidsequenz besteht wie oben beschrieben aus Glycin, Seitenketten-Boc-geschützten Lysin und Phenylalanin, die terminal mit dem Boc-geschützten GCP-Baustein (**55**), der in einer separaten Synthese hergestellt wurde (beschrieben auf Seite 54f), verknüpft wurde.

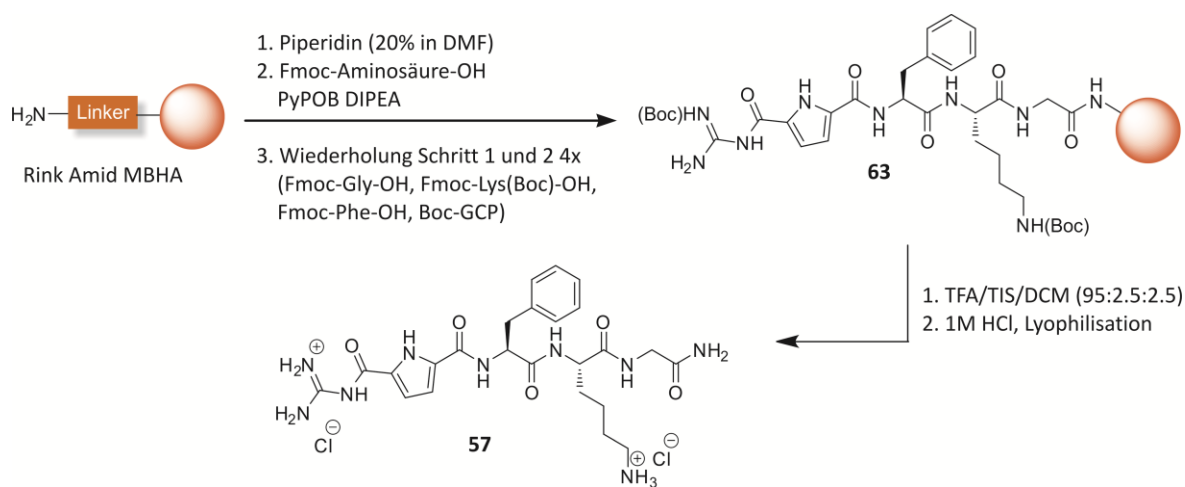
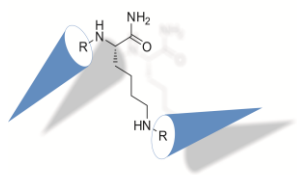


Abbildung 34. Synthese von Ligand **57**.

Der noch völlig geschützte Ligand **63** wurde intensiv mit DCM und MeOH gewaschen, um DMF und andere Verunreinigungen zu entfernen und anschließend mit einer Lösung aus TFA/TIS/DCM vom Harz abgespalten, wobei TIS als Kationfänger fungiert.<sup>[505]</sup> Gleichzeitig wurden unter diesen stark sauren Bedingungen die Boc-Schutzgruppen von Lysin und GCP entfernt. Das Rohprodukt wurde mit kaltem Diethylether ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der gelblich-weiße Feststoff war in Wasser löslich und nach Lyophilisation konnte das Rohprodukt (78 mg) als TFA-Salz erhalten werden. Die Analyse des Rohprodukts mittels HPLC zeigte einen Anteil von ca. 65 % des gewünschten Produkts. Die weitere Aufarbeitung erfolgte durch Umkehrphasen-MPLC. Es konnten 47 mg (50 % Ausbeute) eines weißen, voluminösen Feststoffs gewonnen werden, der mit wässriger HCl-Lösung (0.1 M) umgesalzen wurde. Der Austausch von Trifluoracetat mit Chlorid-Anionen ist notwendig, da das Acetat mit den GCP-Einheiten (die bekanntlich für die Bindung von Carboxylaten entwickelt wurden) interagieren könnte. Dies kann zu einer Verfälschung der Resultate der Bindungsaffinitätsuntersuchungen führen. Daher werden alle Liganden als HCl-Salz eingesetzt und nicht als TFA-Salz. Mittels analytischer HPLC wurde für den einarmigen Liganden **57** eine Reinheit von ca. 95 % ermittelt.

## 4.1.2. Zweiarmer Ligand



Für die Synthese des zweiarmligen Liganden wurde als erste Aminosäure Fmoc-Lysin(Fmoc)-OH (**64**) an das *Rink Amid MBHA* Harz gekuppelt. Die Einführung von Lysin-Einheiten eröffnet somit eine einfache Möglichkeit, verzweigte Peptide aufzubauen. (Die Verwendung von Lysin als Grundgerüst wird bei der Herstellung der drei- und vierarmigen Liganden weiter verfolgt werden.) Nachdem beide *Fmoc*-Schutzgruppen vom Lysinbaustein entfernt worden waren, konnten parallel die Peptidsequenzen analog zu der des einarmigen Liganden **57** aufgebaut werden, indem nacheinander Glycin, Lysin, Phenylalanin und der GCP-Baustein gekuppelt wurden (Abbildung 35).

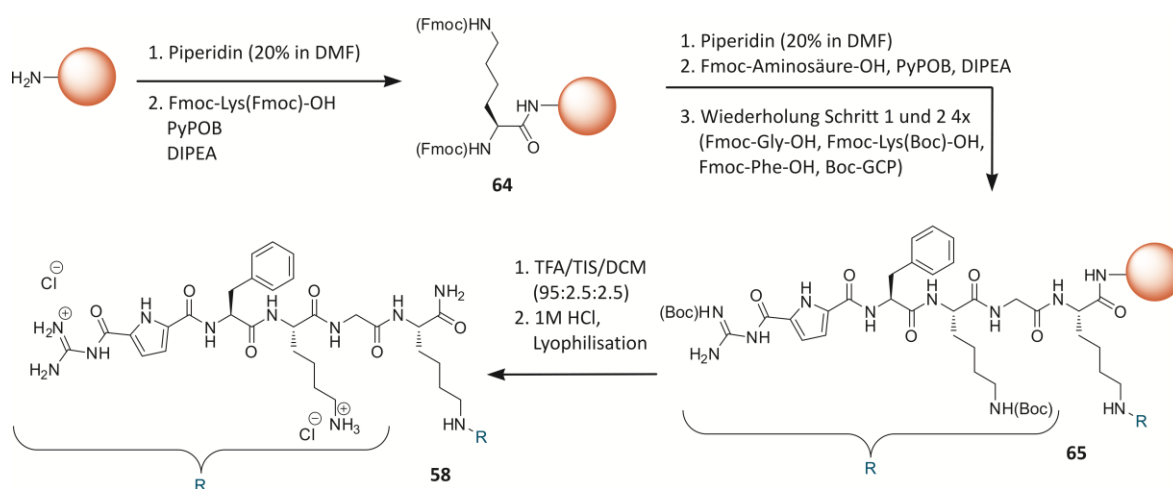
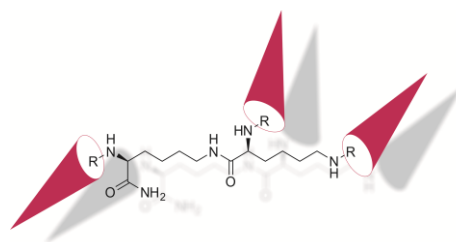


Abbildung 35. Synthese des zweiarmligen Liganden **58**.

Nach Abspaltung und Isolierung des Rohprodukts wurde dieses mittels MPLC weiter gereinigt. Es konnten so 98 mg (Ausbeute 23 %) eines weißen Feststoffs (**58**) mit einer Reinheit von >90 % erhalten werden. Für den Austausch des Gegenions wurden 12 mg des Feststoffs mit 0.1 M HCl versetzt und lyophilisiert.

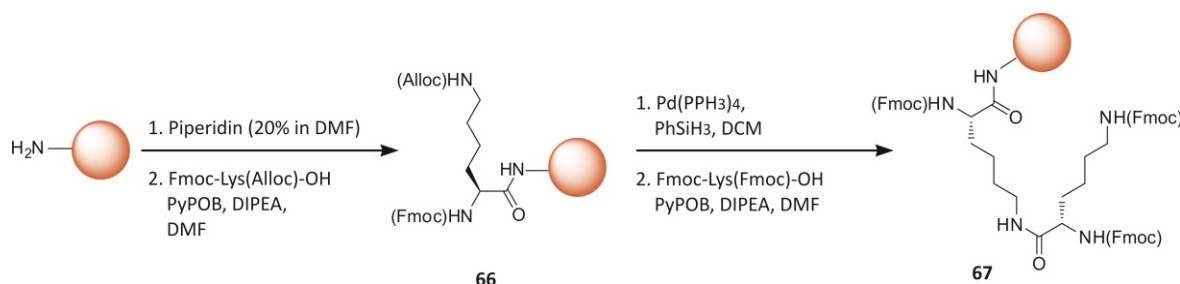
## 4.1.3. Dreiarmlige Liganden



Der Aufbau der dreiarmligen Liganden erfolgt durch Verzweigung von zwei aneinander gekuppelten Lysin-Einheiten. Durch Verwendung orthogonal geschützten Lysins (Fmoc-Lysin(Alloc)-OH, **66**) kann selektiv an der Seitenkette die Kupplung stattfinden und gleichzeitig die Hauptkette unangetastet bleiben. Dafür wird die Alloc-Schutzgruppe der Seitenkette Pd-katalytisch unter Zuhilfenahme von  $\text{PhSiH}_3$  entfernt, um dort dann das freie Amin mit doppelt Fmoc-geschütztem Lysin zu verknüpfen. Nach

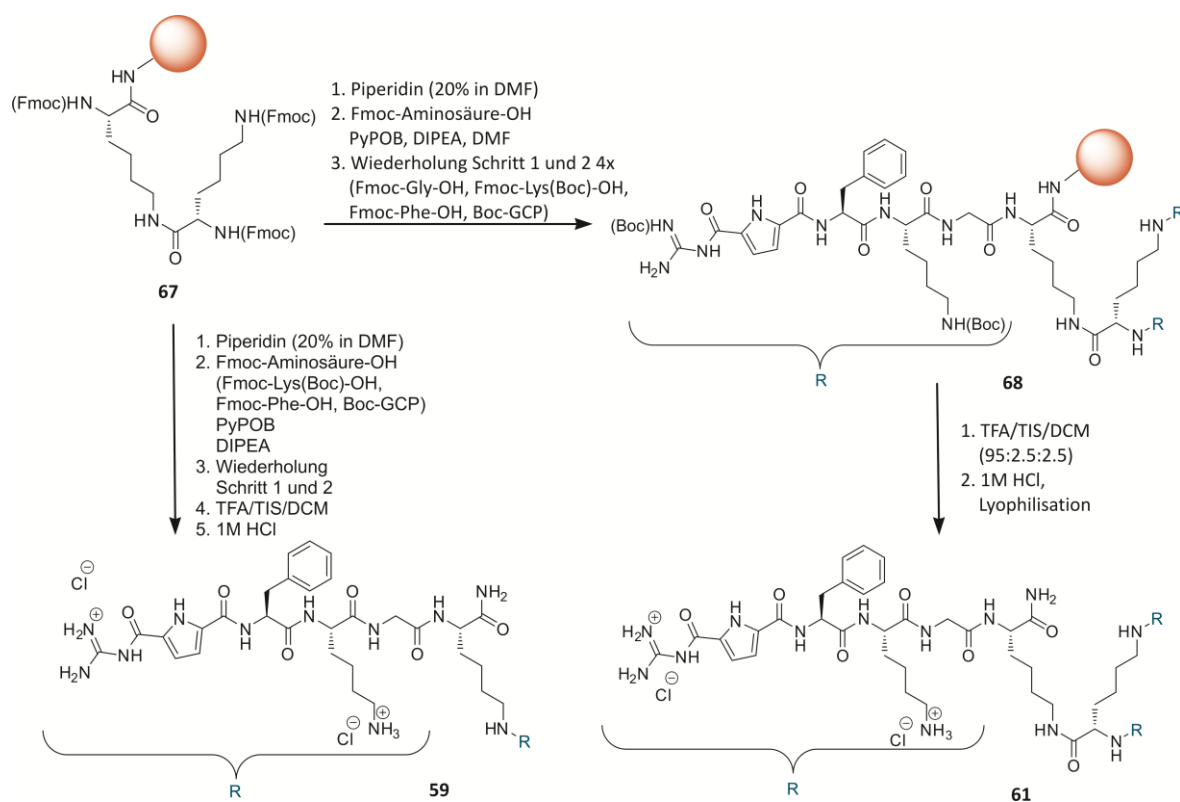
der Entfernung der Alloc-Schutzgruppe der Seitenkette wird das freie Amin mit doppelt Fmoc-geschütztem Lysin verknüpft. Nach

darauffolgender Fmoc-Entschützung stehen somit drei freie Amin-Funktionen an einem Molekülbaustein (**67**) zum Aufbau der Peptidsequenz zur Verfügung (Abbildung 36).



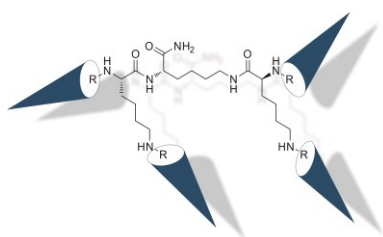
**Abbildung 36.** Genereller Aufbau der dreiarmligen Liganden.

Die Herstellung von Ligand (GKF-GCP)<sub>3</sub> (**59**) erfolgte nach Aufbau des dreiarmligen Grundgerüsts indem parallel die Sequenz Glycin, Lysin, Phenylalanin und GCP erstellt wurde. Es konnten 37 mg (8 %) eines weißen Feststoffs mit einer Reinheit von >80 % erhalten werden. Bei Ligand **61** erfolgte der Aufbau der Sequenz invers [(GKF-GCP)<sub>3</sub>], wobei die Position von Phenylalanin und Lysin vertauscht wurden, wieder mit terminalem GCP. Es konnten 5 mg eines weißen, voluminösen Feststoffs erhalten werden. Nach dem Umsalzen wurden 3 mg Feststoff mit einer Reinheit von >90 % erhalten.



**Abbildung 37.** Synthesen der dreiarmligen Liganden **59** und **61**.

## 4.1.4. Vierarmige Liganden



Vierarmige Liganden sind prinzipiell sehr einfach zugänglich, wobei das Dendron durch Verknüpfung von drei doppelt Fmoc-geschützten Lysinen in zwei Schritten gebildet wird. Auf dieses Grundgerüst aufbauend, können die vier Arme wieder parallel entstehen. Das generelle Syntheschema des dendritischen Grundgerüsts wird in Abbildung 38 dargestellt. Durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen stehen vier Positionen an einem Molekül (**70**) für den Aufbau der Seitensequenzen zur Verfügung.

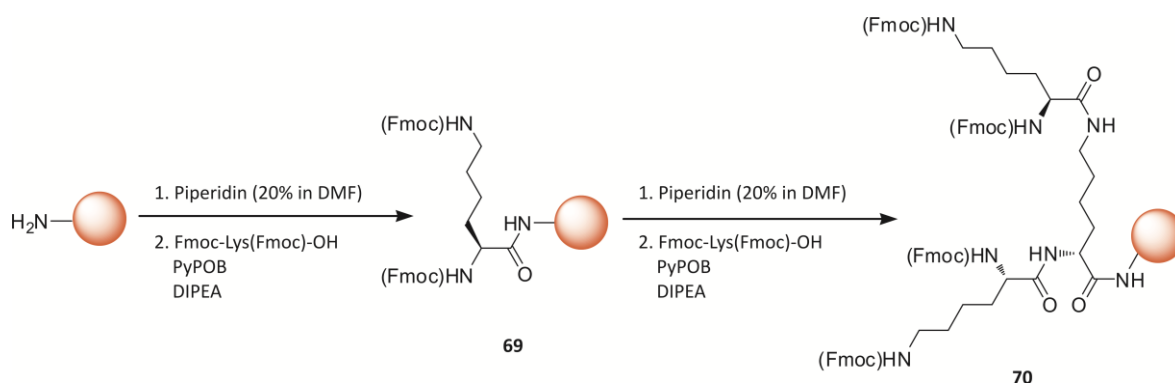


Abbildung 38. Genereller Aufbau der vierarmigen Liganden.

Der erste Schritt der Synthese von (GKF-GCP)<sub>4</sub> (**45**) und (GFK-GCP)<sub>4</sub> (**62**) (Abbildung 39) erfolgte parallel im gleichen Reaktionsgefäß. Hierbei wurden 400 mg *Rink Amid MBHA* Harz eingesetzt, das Grundgerüst aufgebaut und Glycin als erste Aminosäure der Seitenketten gekuppelt. 150 mg des so beladenen Harzes wurden dann in ein zweites Reaktionsgefäß überführt und mit diesem Teil des Harzes Ligand **62** aufgebaut. Mit den verbliebenen ca. 250 mg des Harzes wurde die Herstellung von Ligand **45** fortgeführt, indem nacheinander Lysin, Phenylalanin und GCP an die Seitenketten geknüpft wurden. Nach Abspaltung vom Harz erfolgte die Reinigung des weißen Feststoffs (497 mg) mittels MPLC. Nach dem Umsalzen konnten insgesamt 52 mg (ca. 9 %) eines weißen Feststoffs mit einer Reinheit von >95 % erhalten werden.

Mit dem separierten Harz wurde dann analog zu der Synthese des dreiarmligen Liganden (GFK-GCP)<sub>3</sub> (**61**) eine inverse Peptidsequenz der Seitenketten aufgebaut, bei der Phenylalanin und Lysin vertauscht vorlagen, d. h. bei der Synthese von Ligand **62** wurden zuerst Phenylalanin, dann Lysin und dann terminal GCP gekuppelt. Der hellgelbe Feststoff (281 mg) wurde mittels MPLC gereinigt. Nach Umsalzen des Produkts mit 0.1 M HCl, wurde **62** als weißer, kompakter Feststoff (24 mg, ca. 7 %) mit einer Reinheit >90 % erhalten.



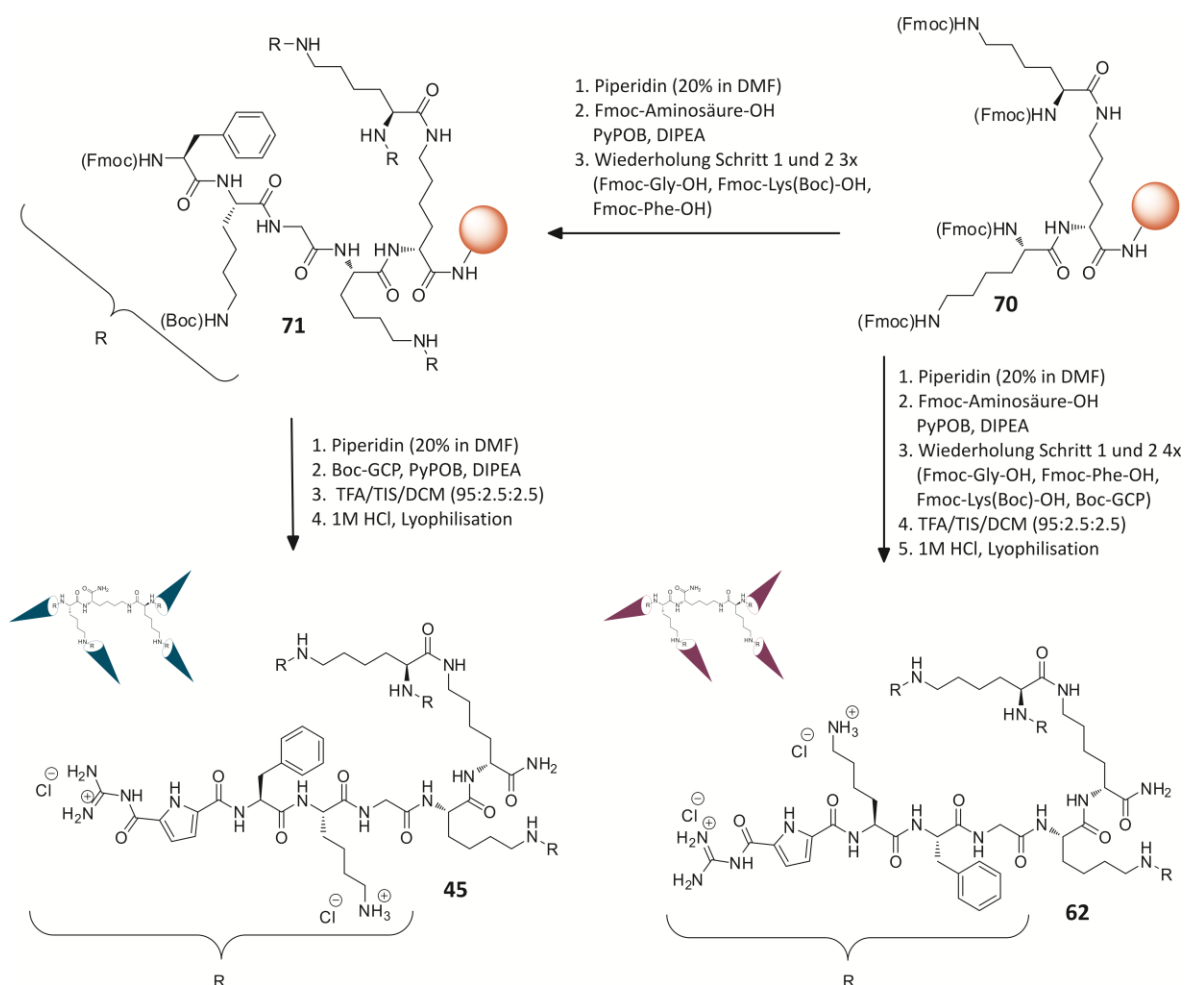


Abbildung 39. Synthese von **45** und **62**.

Um den Einfluss von GCP auf die Bindungsfähigkeit der Liganden untersuchen zu können wurden Verbindungen mit den natürlichen Aminosäuren Lysin und Arginin hergestellt. Als Vergleichsverbindung wurde Ligand **45** ausgewählt. Die Liganden (GKFR)<sub>4</sub> (**72**) und (GKFK)<sub>4</sub> (**73**) weisen dementsprechend terminal eine Lysin- bzw. eine Arginin-Einheit auf (Abbildung 40). Der GCP-Baustein dient der effizienten Bindung von Oxo-Anionen und soll, eingebaut in die hier verwendeten Liganden, gewinnbringend in molekulare Erkennungsprozesse einbezogen werden. Durch Einbinden der GCP-Einheit in Transfektionsvektoren konnten höhere Transfektionseffizienzen, durch verbesserte DNS-Bindung, erhöhte Pufferkapazität und Abschirmung vor DNS-Abbau in den Zellen, erzielt werden (*vide supra*).

Die Synthesen erfolgten ebenfalls unter Standardfestphasenpeptidsynthese-Bedingungen, wie sie schon für die Herstellung der anderen vierarmigen Verbindungen gedient haben. Für Ligand **73** wurden nach Aufbau des vierarmigen Grundgerüsts entsprechend Glycin, Lysin, Phenylalanin und nochmal Lysin gekuppelt. Um Liganden **72** zu erhalten wurde die Seitensequenzen entsprechend mit Glycin, Lysin, Phenylalanin und Arginin aufgebaut. Der Unterschied der beiden Synthesen zu der des **45**-Analogon bestand nur darin, dass die terminalen Aminosäuren noch Fmoc-geschützt waren. Die Schutzgruppe wurde jeweils entfernt und das freie Amin mit Ac<sub>2</sub>O in DMF acetyliert. Ligand **73**

wurde mittels MPLC gereinigt und schließlich umgesalzen. Ligand **73** wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 9 % und einer Reinheit von >90 % isoliert. Die Reinigung von Ligand **72** lief sehr gut. Nach einem MPLC-Lauf konnten 136 mg (19 %) eines sauberen Feststoffs isoliert werden. Zum Umsalzen wurden 26 mg des Feststoffs mit 0.1 M HCl versetzt und lyophilisiert, wobei ein weißer kompakter Feststoff mit einer Reinheit von >90 % erhalten wurde.

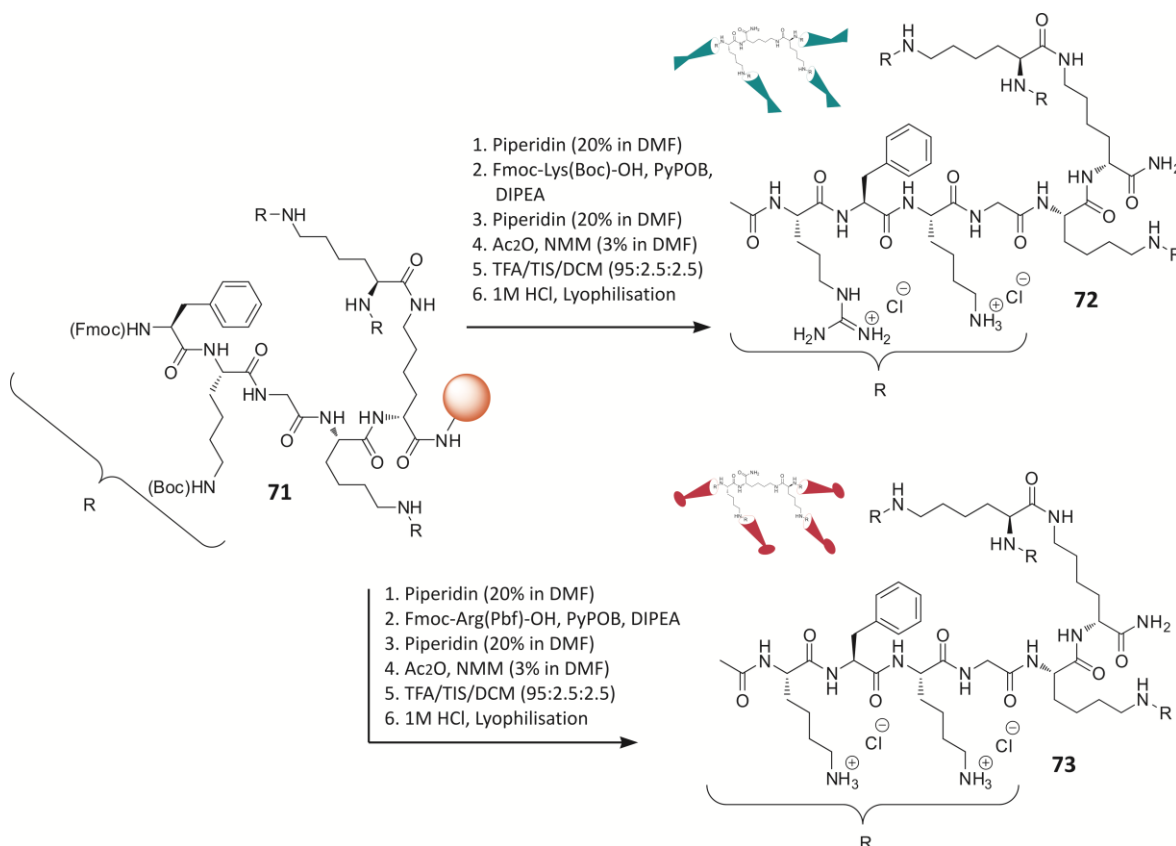
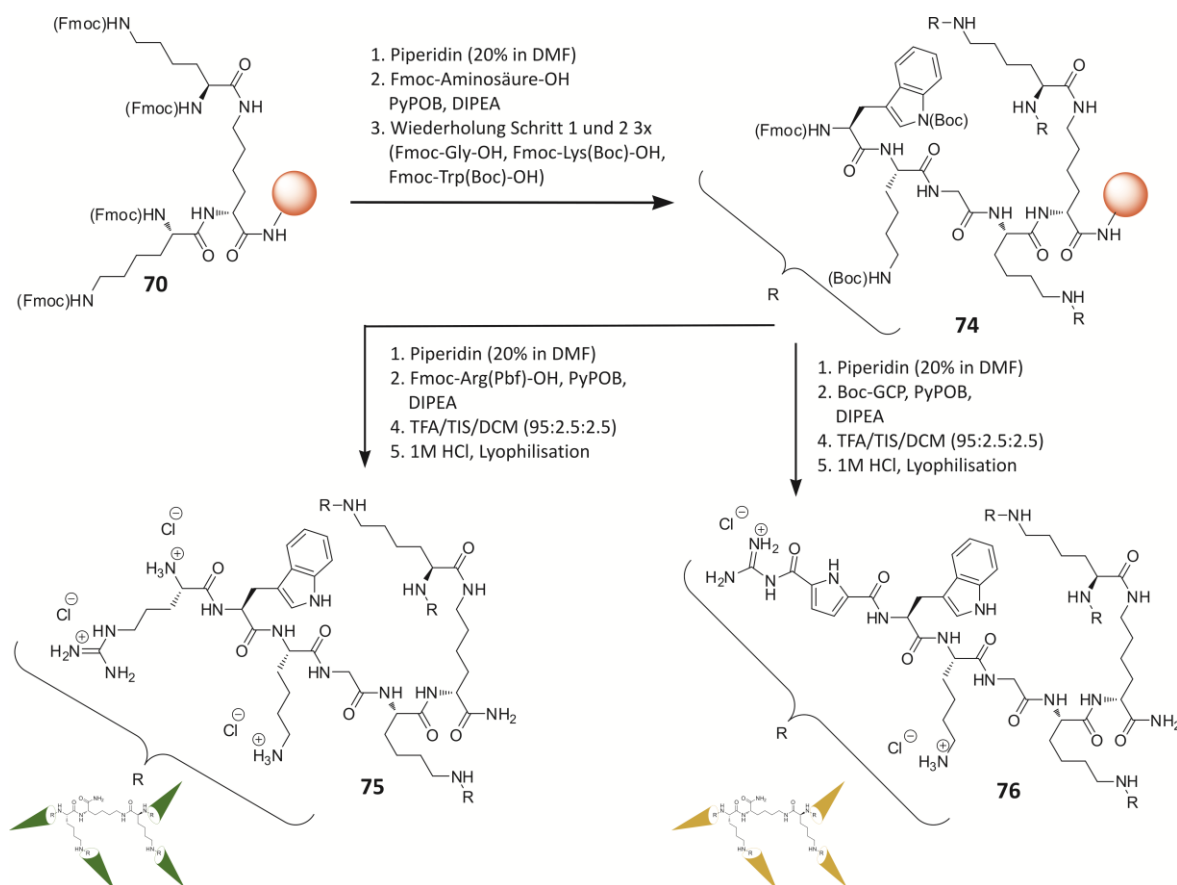


Abbildung 40. Synthese von **72** und **73**.

Desweiteren wurden Verbindungen mit Tryptophan anstelle des Phenylalanins hergestellt, um einen weitergehenden Einblick in die Einflüsse der individuellen Aminosäuren zu erhalten und somit Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersuchen zu können. Tryptophan kann über den Indolstickstoff zusätzlich Wasserstoffbrücken ausbilden und ist polarer als Phenylalanin. Für eine direkte Vergleichbarkeit der Ligandeneigenschaften wurden, analog zu den Liganden (GKFR)<sub>4</sub> (**72**) und (GKF-GCP)<sub>4</sub> (**45**), die zwei Tryptophan tragende Liganden (GKWR)<sub>4</sub> (**75**) und (GKW-GCP)<sub>4</sub> (**76**) synthetisiert (Abbildung 41). (GKWR)<sub>4</sub> (**75**) wurde als vielversprechendste Verbindung bei dem Oberflächenerkennungsprozess der  $\beta$ -Tryptase eingesetzt. Die Synthese von Ligand **75** basiert auf den Vorschriften von *Wich* und *Schmuck*.<sup>[32]</sup> Allerdings wurde anstelle von *Rink Amid* Harz, die *MBHA*-Modifikation des Harzes verwendet, die etwas säuresensitiver ist. Nach Aufbau des Lysin-Grundgerüsts wurden erst Glycin und Boc-geschütztes Lysin an die Seitenarme gekuppelt. Auf die Kupplung von Tryptophan, ebenfalls Boc-geschützt, erfolgte die Kupplung von Pbf-geschütztem Arginin. Im Gegensatz zu Ligand **72** ist bei **75** das terminale Arginin nicht acetyliert. Das Rohprodukt wies in der HPLC-Analyse zahlreiche Nebenprodukte auf. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte

zuerst mit RP-MPLC. Die danach erhaltenen 30 mg Rohprodukts wurden aufgeteilt und mittels semi-präparativer HPLC weiter gereinigt. Die Reinigung in einem isokratischen Lauf mit 30 % MeOH+0.05 % TFA war nicht erfolgreich. Weitere 19 mg des Feststoffs wurden semi-präparativ und isokratisch bei 42 % MeOH+0.05 % TFA chromatografisch separiert und es konnte ein weißer voluminöser Feststoff (10 mg) erhalten werden. Nach Umsalzen wurde ein weißer, kompakter Feststoff mit einer Ausbeute von 2 % und einer Reinheit von >90 % erhalten. Insgesamt verlief die Synthese der Sequenz GKFR einfacher und lieferte weniger Nebenprodukte, als die der Sequenz GKWR. Dies könnte z. B. sterische Gründe, haben, da Tryptophan sterisch anspruchsvoller als Phenylalanin ist und somit die Kupplung des Pbf-geschützten, ebenfalls sterisch anspruchsvollen Arginins erschwert wird. Nach der Synthese von Ligand **76** (Kupplung der Bausteine Glycin, Boc-Lys, Boc-Trp und GCP) wurde das nach Abspaltung vom Harz erhaltene Rohprodukt erst mittels MPLC und abschließend semi-präparativ gereinigt. Nach Umsalzen wurden 6 mg (2 %) **76** als hellbrauner Feststoff erhalten mit einer Reinheit von >95 %.



**Abbildung 41.** Synthese der Liganden (GKWR)<sub>4</sub> (**75**) und (GKW-GCP)<sub>4</sub> (**76**).

Eine weitere Optimierungsmöglichkeit von Transfektionsvektoren ist die Erhöhung von positiven Ladungen, da die Bindung der anionischen DNS durch die kationischen Liganden auf elektrostatische Wechselwirkungen basiert (*vide supra*). Ligand (GKWK-GCP)<sub>4</sub> (**77**) ist die einzige Verbindung mit fünf Bausteinen in der Seitenarmsequenz, die durch Glycin, Lysin, Tryptophan, Lysin und terminalem GCP gebildet wird und somit zwölf mögliche positive Ladungen aufweist (siehe

Abbildung 42). Während der Synthese zeigte sich abermals, dass es herausfordernd ist, GCP neben eine zwar geschützte, aber basische und flexible Aminosäure zu kuppeln. Zudem ist der Arm aufgrund seiner Länge flexibler, so dass intramolekulare Wechselwirkungen vielleicht die Zugänglichkeit zu den freien Aminen beeinträchtigen. Nach Reinigung des gelblichen Feststoffs (637 mg) mittels MPLC wurden 13 mg eines weißen, voluminösen Feststoffs erhalten. Nach Umsalzen wurde **77** als weißer, kompakter Feststoff (9 mg, 2 %) mit einer Reinheit von >95 % isoliert.

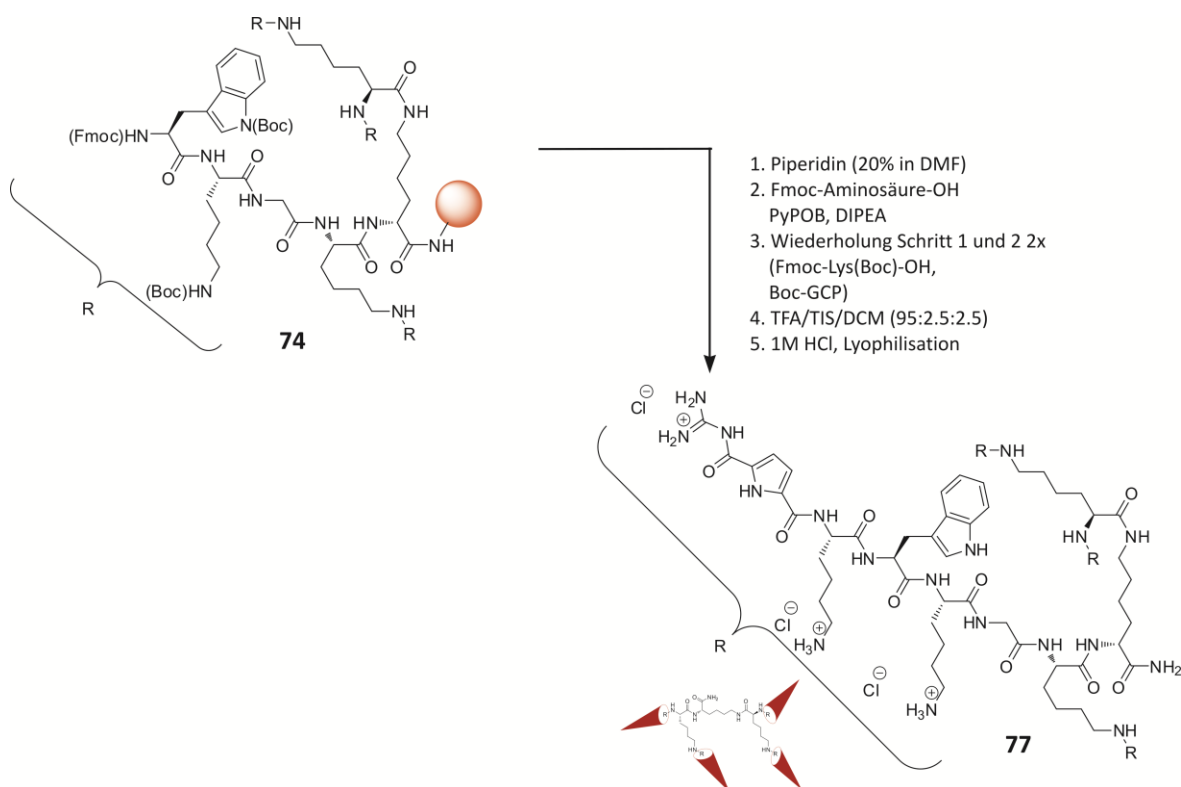
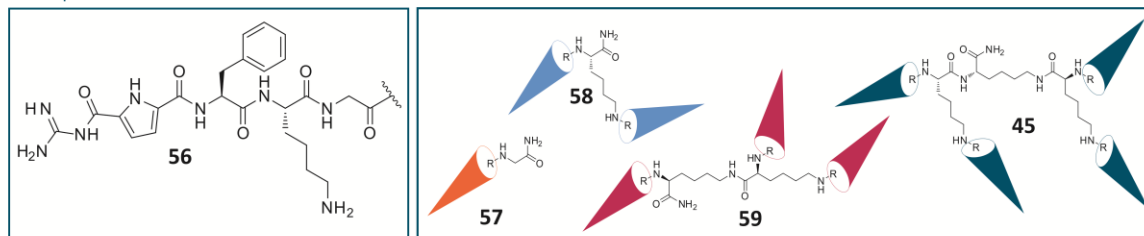


Abbildung 42. Synthese von (GKWK-GCP)<sub>4</sub> (**77**).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorstehend beschriebenen Synthesen alle erfolgreich waren, wobei jedoch die Ausbeuten der Produkte mit >80 % Reinheit teils stark variierten und von knapp 1 % bis zu 50 % reichen. Die Ausbeute an Rohprodukten betrug ca. 60–80 %. Die höchsten Ausbeuteverluste sind auf die säulenchromatografische Isolierung mittels MPLC zurückzuführen, d. h. die Reinigung stellt somit eine der größten präparativen Herausforderungen dar. Die MPLC-Läufe müssen immer individuell an das Laufverhalten der Liganden angepasst werden. Die Liganden verhielten sich sehr sensitiv gegenüber den Lauf-Bedingungen, so dass schon eine geringe Veränderungen im Gradienten über eine erfolgreiche Separation entscheiden konnte. Je unverzweigter die Verbindung, desto weniger Nebenprodukte wurden gebildet und um so leichter erfolgte die säulenchromatografische Separation. Die Reihenfolge der Aminosäuren nahm zudem Einfluss auf Sauberkeit und Separationsverhalten der Verbindungen. So erwiesen sich die Kupplung von Arginin nach Tryptophan und GCP nach Lysin als aufwendiger, da sie wegen der mäßigen Ausbeuten öfter wiederholt werden mussten. Diese Verbindungen waren

dementsprechend mit mehr Nebenprodukten belastet, als die der analogen, z. B. Phenylalanin-enthaltenen Liganden. Die hier beschriebenen Liganden konnten in ausreichenden Mengen erhalten werden und wurden für die nachfolgenden Untersuchungen alle als HCl-Salz eingesetzt. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Liganden wird in Abbildung 43 gegeben.

## Leitsequenz 1



## Leitsequenz 2

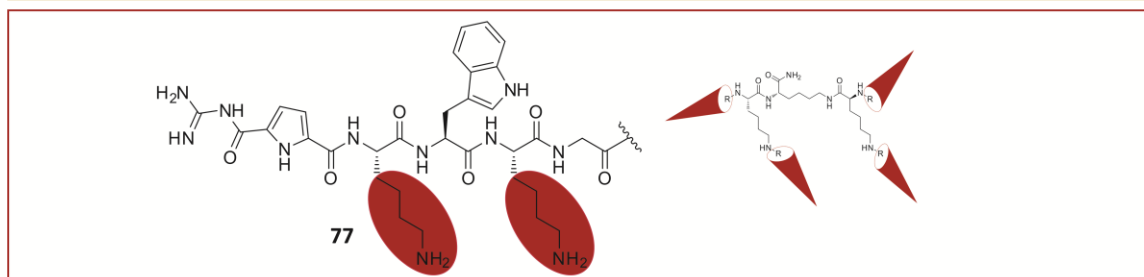
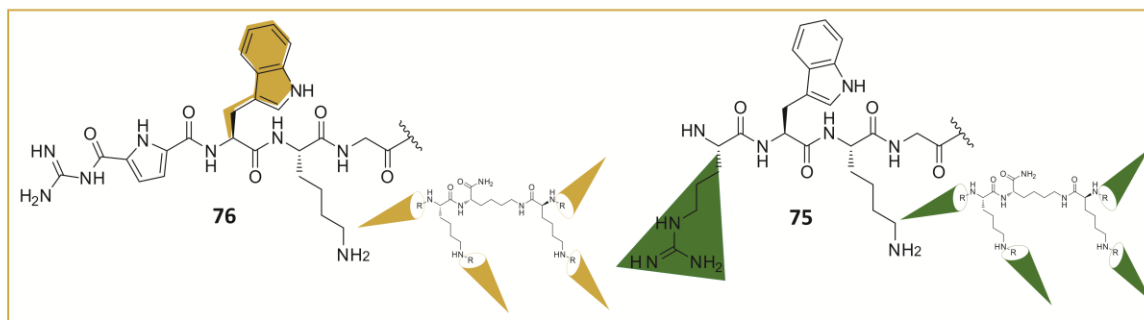
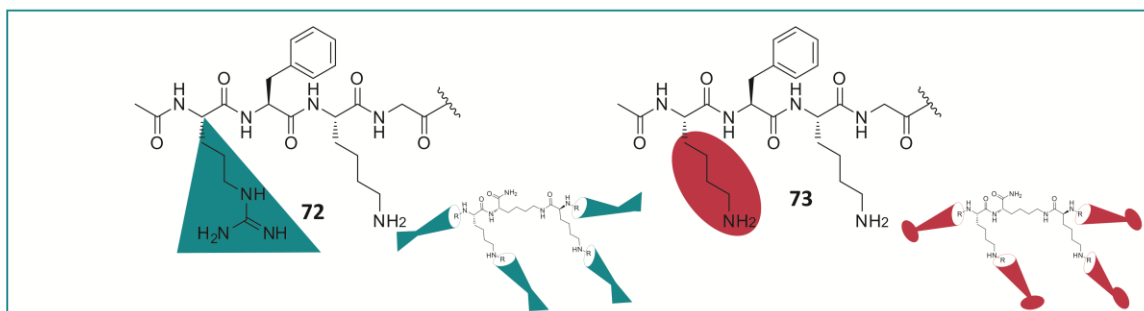
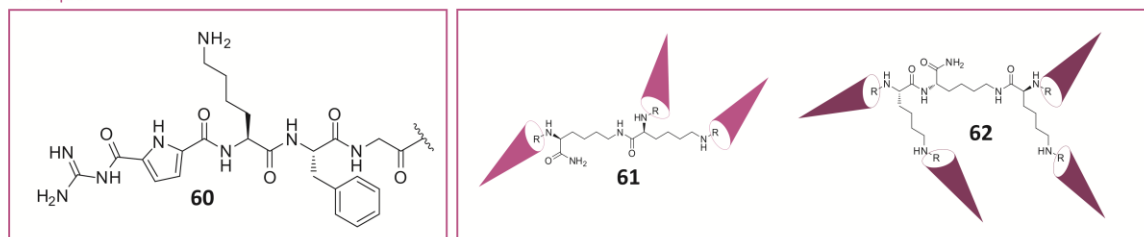
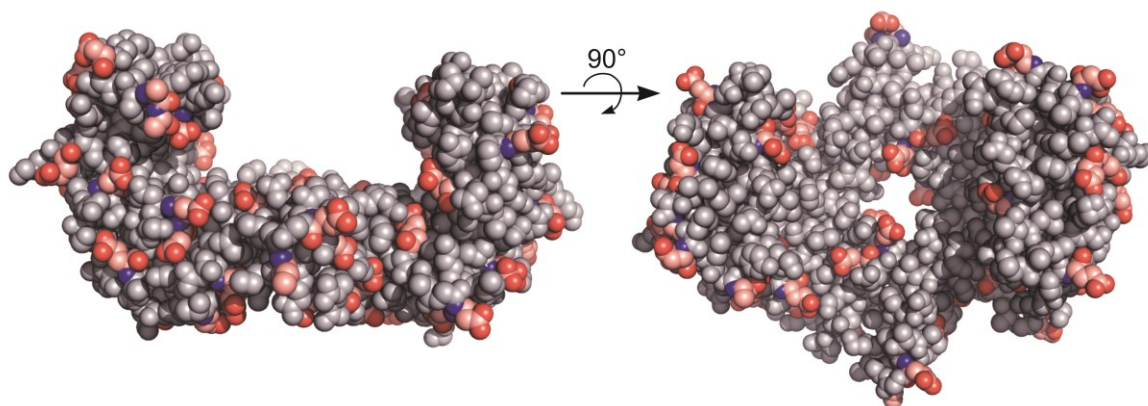


Abbildung 43. Übersicht der Liganden.

## 4.2. Multivalente Liganden als Stabilisatoren von 14-3-3 $\zeta$ -Protein-Protein-Interaktionen

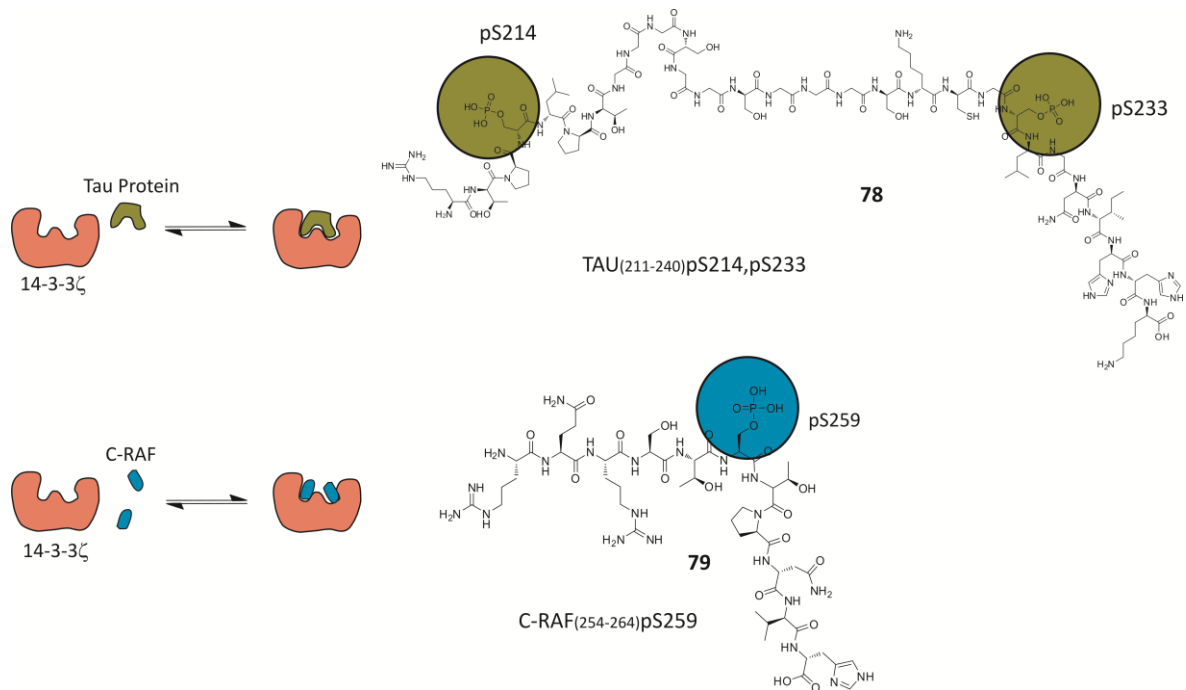
Wie schon eingangs beschrieben, konnten verschiedenste biologische Ziele<sup>[506]</sup> wie DNS<sup>[465,507]</sup> oder das Enzym  $\beta$ -Tryptase<sup>[32,33]</sup> erfolgreich mit multivalenten Liganden adressiert werden. *Wilson et al.* stellte 2015 den ersten multivalenten Liganden für die Modulation einer PPI vor, nämlich einen Inhibitor für die p53/HDM2-Wechselwirkung.<sup>[128]</sup> Multivalente Stabilisatoren wurden, soweit bekannt, bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Das 14-3-3 $\zeta$ -Protein ist aufgrund von zahlreichen Asparagin- und Glutaminsäure-Einheiten, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden, leicht azidisch; veranschaulicht in Abbildung 44. Daher ist es naheliegend, diese Asparagin- und Glutaminsäuren mit polykationischen Verbindungen zu adressieren und letztere so an die Oberfläche des Proteins zu binden.



**Abbildung 44.** 14-3-3 $\zeta$ -Protein-Dimer in Seiten- und Topansicht. Hervorgehoben sind die Aminosäuren mit azidischen Seitenketten, also Asparagin- und Glutaminsäure.

Das 14-3-3 $\zeta$  Protein wurde von *Maria Bartel* und *Jeroen Briels* aus dem Arbeitskreis von *Christian Ottmann* exprimiert und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Des weiteren wurde die 14-3-3 $\zeta$  Wechselwirkung mit C-RAF und Tau Protein als Ziel PPI ausgewählt. Sowohl von C-RAF als auch vom Tau Protein werden kommerziell erhältliche Peptidfragmente verwendet, die bekannte Bindungsmotiv(e) für 14-3-3 $\zeta$  aufweisen; beide sind in Abbildung 45 dargestellt. C-RAF besteht aus einer elf Aminosäuren umfassenden Peptidsequenz  $\text{H}_2\text{N}$ –<sup>254</sup>RQRST–**pS259**–TPNVH<sup>264</sup>–OH mit dem 14-3-3 $\zeta$ -Bindungsmotiv um pS259. Das Peptidfragment ist fast ein Drittel kleiner als das des Tau Proteins, das aus 29 Aminosäuren besteht, und bindet mit einer 1 : 1-Stöchiometrie an ein 14-3-3 $\zeta$ -Monomer. Dagegen kann das Tau Proteinfolefragment  $\text{H}_2\text{N}$ –<sup>211</sup>RTP–**pS214**–LPTGGGSGGGGSKCG–**pS233**–LGNIHHK<sup>240</sup>–OH über zwei 14-3-3 $\zeta$ -Bindungsmotive um die phosphorylierten Serine pS214 und pS233 binden. Deshalb wird für die Experimente ein Peptidfragment verwendet, das die Aminosäuren 211 bis 240 umfasst und mit einer 1 : 1-Stöchiometrie an das 14-3-3 $\zeta$ -Dimer bindet. Beide Wechselwirkungen sind transient und können durch eine Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden.



**Abbildung 45.** Die Peptidsequenzen des C-RAF- und des Tau Protein-Fragments. Schematisch dargestellt ist die jeweilige Wechselwirkung von Tau Protein (grün) bzw C-RAF (blau) mit 14-3-3ζ (orange).

Mit Hilfe der multivalenten Liganden lassen sich zunächst folgende Fragestellungen untersuchen:

- Kann durch die Bindung der polykationischen Verbindungen an die 14-3-3ζ-Oberfläche die Wechselwirkung von 14-3-3ζ mit einem Partnerpeptid moduliert werden? Agieren die Liganden als Stabilisatoren oder Disruptoren?
- Hat die Anzahl der Seitenarme einen Einfluß auf die Bindungsstärke der Liganden an den jeweiligen Proteinkomplex? Welchen Einfluss – stabilisierend oder destabilisierend – hat die veränderte Bindigkeit auf den Proteinkomplex?
- Welchen Einfluss nimmt das künstliche Anionenbindungsmotiv auf die Bindung der Liganden an den Proteinkomplex und die Modulation der PPI? Kann GCP gewinnbringend in den Oberflächenerkennungsprozess und die Stabilisierung des Proteinkomplexes mit einbezogen werden?
- Welchen Einfluss nehmen der Aufbau und die Wahl der Aminosäuren der Peptidsequenz?

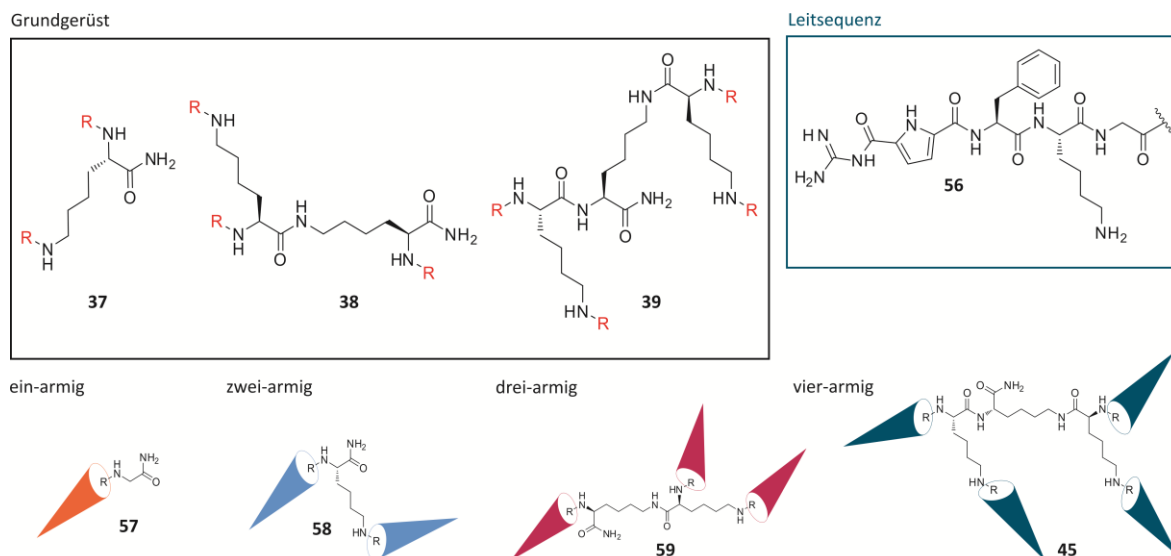
Dafür werden verschiedene Methoden verwendet, die unterschiedliche Einblicke in Bindung oder Modulation gewähren.

#### 4.2.1. PPI-Modulation durch multivalente Liganden

Die hier verwendeten multivalenten Liganden (Abbildung 46) wurden mittels Festphasenpeptidsynthese gewonnen, beschrieben in Kapitel 4.1. Als Leitsequenz für die



multivalenten Liganden wurde eine Abfolge der natürlichen Aminosäuren Glycin, Lysin und Phenylalanin, sowie des Oxo-Anionenbindungsmotivs GCP festgelegt. Durch Kombination mit den verschiedenen dendritischen Grundgerüsten konnte eine Serie, bestehend aus vier Liganden hergestellt werden, die unterschiedliche Bindungs-Multivalenzen bei gleicher Seitenarmsequenz aufweisen.



**Abbildung 46.** Die hier verwendeten multivalenten Liganden weisen alle die selbe Seitenkettensequenz auf. Es finden ein- bis vierarmig Derivate Anwendung.

#### 4.2.1.1. Fluoreszenzpolarisations-Messungen

Zunächst wurden Fluoreszenzanisotropie-Experimente durchgeführt, eine geläufige Methode zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten in der biochemischen Forschung. Sie kann genutzt werden, um beispielsweise Protein-Protein- oder Protein-DNS-Assoziationen,<sup>[508–511]</sup> Protein-Denaturierung und Membranviskositäten zu erforschen oder auch für Immunoassays.<sup>[512]</sup>

Die Methode basiert generell auf zwei Eigenschaften für Fluorophore. Erstens, wird ein Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt, so ist das emittierte Licht ebenfalls polarisiert und zweitens, die Intensität dieser Polarisation oder Fluoreszenz-Anisotropie ist abhängig von der Bewegung des Fluorophors. Hier können beide Messgrößen, Polarisation und Anisotropie, genutzt werden, da sie mathematisch ineinander umwandelbar sind. Polarisation  $P$  und Anisotropie  $r$  sind über die beiden folgenden Gleichungen 1 und 2 miteinander verknüpft.

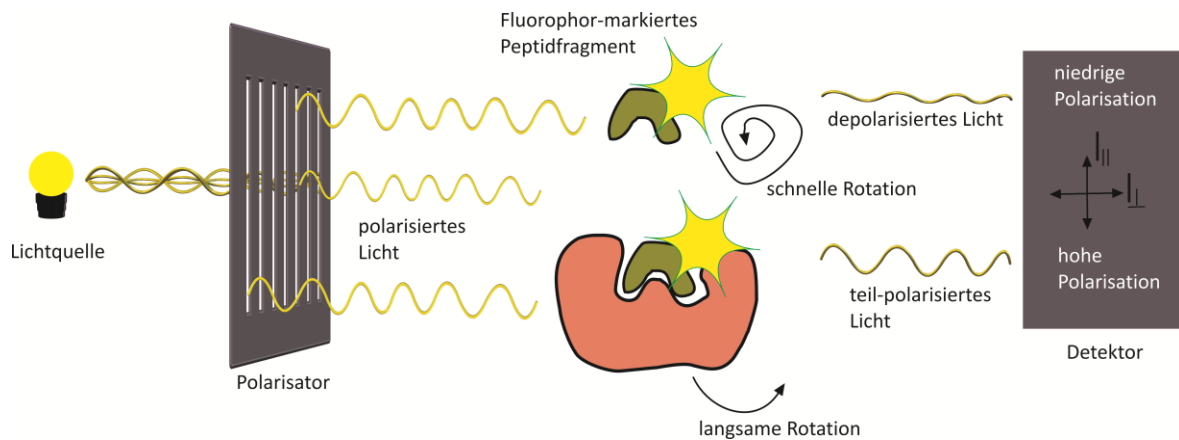
$$r = \frac{2P}{3-P} \quad (1)$$

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad (2)$$

In einer homogenen isotropischen Lösung ist die Orientierung Fluorophor-markierter Proben willkürlich. Diese Proben werden nun vertikal polarisiertem Licht ausgesetzt, dabei ist der



elektrische Lichtvektor ebenfalls vertikal orientiert. Die Anregung der Fluorophore erfolgt jedoch nicht gleich. Die Übergangsmomente für Absorption und Emission liegen entlang spezifischer Richtungen im Molekül.



**Abbildung 47.** Schematische Darstellung der Fluoreszenzpolarisations-Messung.

Daher werden Fluorophore, deren Absorptionsübergangsmomente parallel zum elektrischen Lichtvektor orientiert sind, hier im Beispiel vertikal, bevorzugt angeregt. Somit ist die Anregung gewissermaßen selektiv, was dazu führt, dass ein Überschuss an ausgerichteten, sich im angeregten Zustand befindlichen Fluorophoren entsteht. Die Lebensdauer dieses angeregten Zustands liegt zwischen 1–10 ns und somit bleibt dem Molekül genügend Zeit zu rotieren. Aufgrund dieser Rotationsdiffusion ändert sich auch die Ausrichtung des Übergangsmoments, was zu einer Depolarisation des emittierten Lichts führt. Die Rate dieser rotationalen Diffusion hängt dabei von der Größe und/oder der Form des rotierenden Moleküls ab sowie von der Viskosität des verwendeten Lösungsmittels. Daraus ergibt sich für kleinere Moleküle eine relativ hohe rotationale Diffusionsrate, die durch Bindung an ein Makromolekül, wie DNS oder ein Protein, verringert werden kann. Als Resultat kann man für kleine, ungebundene Moleküle niedrige Polarisationswerte messen, während die gebundenen Proben durch mangelnde Bewegung hohe Polarisationswerte aufweisen (Abbildung 47).<sup>[513–515]</sup> Die Messung erfolgt dadurch, dass der Detektor beide Intensitäten des vertikal emittierten Lichts  $I_{||}$ , parallel zum polarisierten Licht, und des horizontal emittierten Lichts  $I_{\perp}$ , also senkrecht zum polarisierten Licht, zum Zeitpunkt der Anregung erfasst. Mit diesen beiden Werten können dann sowohl Polarisation  $P$  als auch Anisotropie  $r$ , Gleichungen 3 und 4 folgend, berechnet werden.<sup>[514]</sup>

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad (3)$$

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{S} \quad (4)$$

$S$  ist die Totalintensität  $I_{||} + 2I_{\perp}$  der Probe. Die Anisotropie hat den Vorteil, dass diese durch die Totalintensität  $S$  normalisiert wird, also sich die Intensitäten alle auf die Totalintensität der Probe beziehen. Die Intensitäten können nochmal über den G-Faktor korrigiert werden, einem

instrumentspezifischen Wert,<sup>[516]</sup> der die Sensitivität des Gerätes für die Messung von horizontal und vertikal polarisiertem Licht über das folgende Verhältnis beschreibt:

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{\parallel}} \quad (5)$$

Wobei die Intensitäten  $i_{\perp}$  und  $i_{\parallel}$  genau umgekehrt zu den Intensitäten  $I_{\perp}$  und  $I_{\parallel}$  der Anisotropiemessung bestimmt und mit der horizontalen Intensität  $I_{\perp}$  multipliziert werden. Ist beispielsweise  $G = 2$ , so erfolgt die Detektion von vertikal polarisiertem Licht doppelt so gut, wie die Detektion von horizontal polarisiertem Licht durch den Detektor.

Die Methode wurde in Eindhoven von *Maria Bartel* und *Jeroen Briels* standardmäßig im Arbeitskreis von *Ottmann* eingesetzt, um die Wechselwirkung von 14-3-3ζ mit Partnerpeptiden zu untersuchen, und konnte erfolgreich in Essen übernommen und unter Verwendung des Geräts aus dem Arbeitskreis *Ehrmann* etabliert werden.

### Bestimmung der direkten Bindungskonstante $K_D$

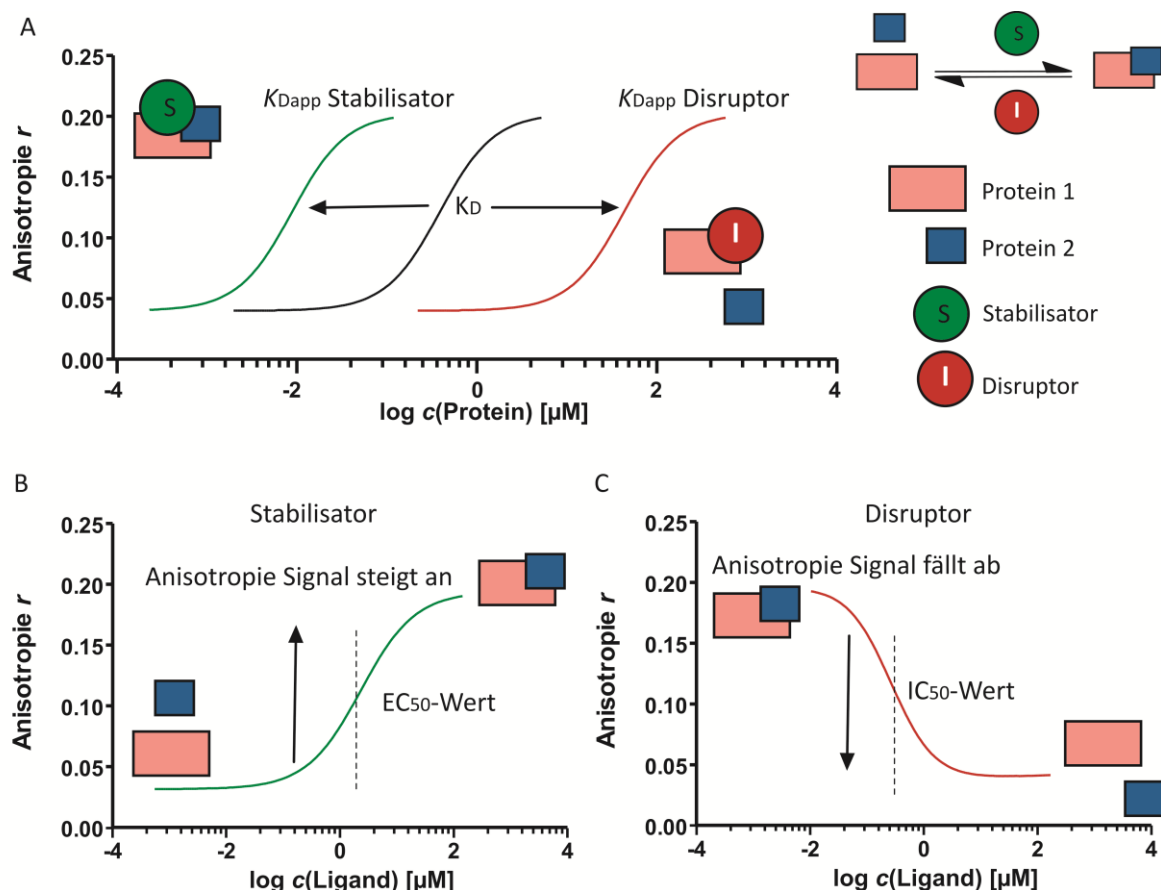
Die Bestimmung der direkten Bindungskonstante  $K_D$  erfolgte über die Vermessung einer Verdünnungsreihe von 14-3-3ζ. Das jeweilige Peptidfragment (FAM–C-RAF oder FAM–Tau Protein + 1 % DMSO) wurde mit einer konstanten Konzentration vorgelegt und mit 14-3-3ζ gemischt. Dies bedeutet, dass bei einem Überschuss von z. B. C-RAF gegenüber 14-3-3ζ, C-RAF weitestgehend frei vorliegt und somit auch schnell rotieren kann. Dadurch ist das emittierte Licht der Probe depolarisiert und das Anisotropiesignal bleibt niedrig. Mit steigender Konzentration von 14-3-3ζ bindet immer mehr C-RAF an das 14-3-3ζ und das emittierte Licht ist zunehmend polarisiert und das Anisotropiesignal steigt. Durch die Vermessung der Verdünnungsreihe erhält man also ein Sättigungsprofil der Konzentration von 14-3-3ζ, das halblogarithmisch aufgetragen sigmoidale Kurven ergibt, die durch nicht lineare Regression an die Meßwerte angepasst werden können.

### Bestimmung der scheinbaren (*apparenten*) Bindungskonstante $K_{Dapp}$

Die Bestimmung der scheinbaren Bindungskonstante erfolgte analog zu der oben beschriebenen  $K_D$ -Wert-Bestimmung mit Ausnahme, dass anstelle von reinem DMSO eine 100 μM Ligandlösung in DMSO mit dem Peptidfragment (FAM–C-RAF oder FAM–Tau Protein) vorgemischt wurde. Die Messungen in An- und Abwesenheit eines Liganden, erlauben über den Vergleich der erhaltenen wahren und scheinbaren Bindungskonstanten Rückschlüsse darauf, ob der Ligand ein Stabilisator oder Inhibitor der betrachteten PPI ist. Es können somit gleichzeitig Stabilisatoren und Inhibitoren identifiziert werden, wobei gilt:  $K_{Dapp}(\text{Stabilisator}) < K_D < K_{Dapp}(\text{Inhibitor})$  (siehe auch Abbildung 48A).

## Bestimmung des $EC_{50}$ -Wertes

Bei der Bestimmung des  $EC_{50}$ -Wertes wird ein Gemisch aus 14-3-3 $\zeta$  und Partnerprotein vorgelegt und eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Liganden angefertigt. Die Bedingungen bei der  $EC_{50}$ -Bestimmung wurden so gewählt, dass die Konzentrationen von 14-3-3 $\zeta$  und des Partnerpeptids *unterhalb* deren jeweiliger Bindungskonstante lag, im Falle von C-RAF/14-3-3 $\zeta$  ungefähr 10-fach und von Tau Protein/14-3-3 $\zeta$  5-fach unterhalb deren jeweiligen  $K_D$ -Werte. Unter diesen Bedingungen findet keine messbare Wechselwirkung von 14-3-3 $\zeta$  mit den Peptiden statt und man erhält ein niedriges Anisotropiesignal, da das Peptidfragment schnell rotieren kann und somit depolarisiertes Licht emittiert. Je mehr nun von einer stabilisierenden Verbindung dazugegeben wird, um so mehr steigt auch der Anteil, der nicht mehr frei beweglichen, markierten Peptide, da diese an 14-3-3 $\zeta$  binden, und das Signal steigt aufgrund der geringen Depolarisierung an (Abbildung 48B). Der  $EC_{50}$ -Wert ist dann die halbmaximale Konzentration, bei der der Effekt auftritt. Daraus kann die Bindungskonstante des Liganden an den Komplex abgeleitet werden, da  $EC_{50}$ -Wert und Bindungskonstante hier korrelieren.

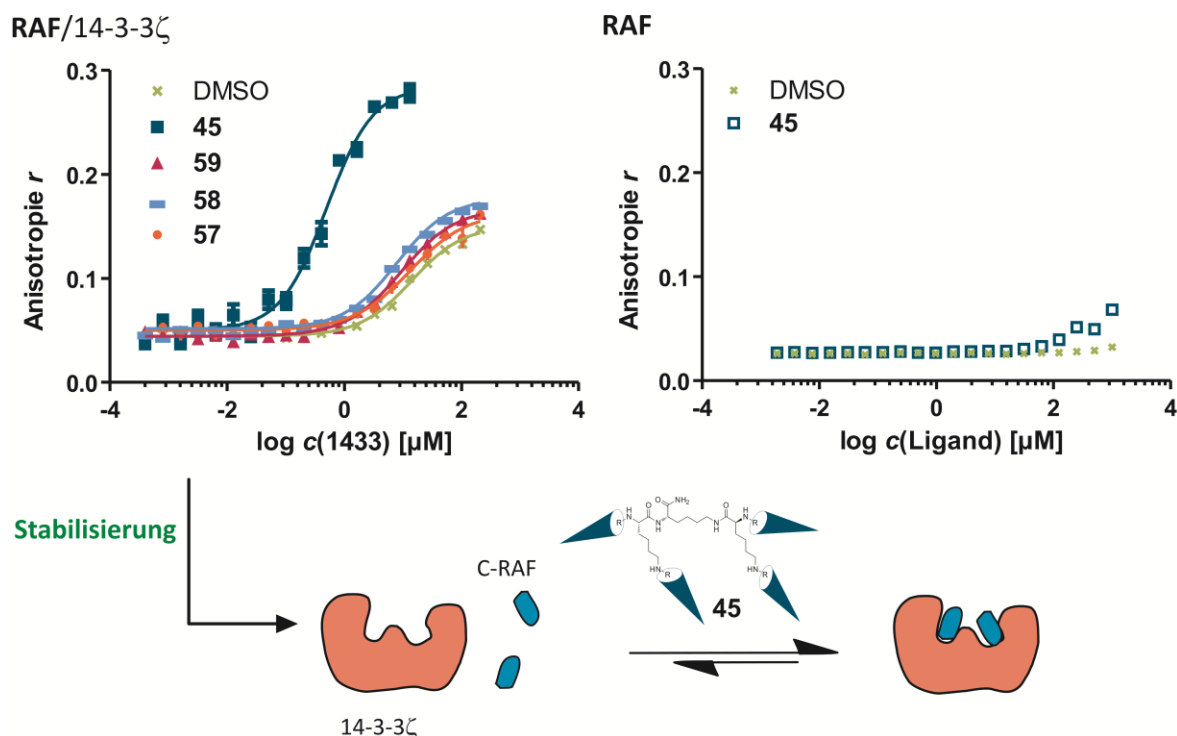


**Abbildung 48.** Schematische Darstellung der verschiedenen FP-Assays. A) Bestimmung der direkten Bindungskonstante ( $K_D$ ) und in Anwesenheit von Modulatoren ( $K_{Dapp}$ ). B) Stabilisierungs-Assay: Bestimmung des  $EC_{50}$ -Wertes. C) Inhibitions-Assay: Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes.

Will man dagegen die  $IC_{50}$ -Werte von Disruptoren bestimmen, wählt man als Startkonzentrationen von 14-3-3ζ und Partnerpeptid Konzentrationen, die ca. 10-fach *über* dem  $K_D$ -Wert liegen. Fertigt man eine Verdünnungsreihe mit dem Inhibitor an, sollte das Signal nun von einem hohen auf einen niedrigen Anisotropiewert fallen, da immer mehr zuvor gebundenes Peptid frei wird und somit wieder schneller rotieren kann. Bei der Untersuchung von Stabilisatoren wählt man also Konzentrationen für die Ziel-PPI, die kleiner als der entsprechende  $K_D$ -Wert sind, und das Anisotropiesignal steigt bei Stabilisierung durch den dritten Bindungspartner an. Inhibitionsbedingungen sind gegenteilig, man startet mit Konzentrationen der PPI-Partner, die weit über dem entsprechenden  $K_D$ -Wert liegen und das Anisotropiesignal fällt bei Disruption der Wechselwirkung ab (Abbildung 48C). Die Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine muss im Assay auf die Untersuchung von Stabilisierung oder Disruption angepasst werden. Durch leichte Variation der Bedingungen erhält man also sowohl einen  $EC_{50}$ -Wert als auch die scheinbare Bindungskonstante  $K_{Dapp}$  der Liganden. Beide Methoden wurden hier angewandt.

Die Fluoreszenzpolarisationsmessung wurde als Endpunktmessung durchgeführt, d. h. die Proben wurden vorher angefertigt und die Verdünnungsreihe in schwarzen 384-Mikrotiter-Platten vorgelegt. Es wurden jeweils 10 µL Probe vermessen und jede Probe als Triplikat. Die Messung erfolgte bei 25 °C. Die Proben wurden in FP-Puffer pH 7.4 (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, 0.1 % Tween20, 0.1 % BSA) angesetzt, wobei die Stammlösungen der Liganden in DMSO verwendet wurden (die Konzentrationen der Stammlösungen wurden den jeweiligen Löslichkeiten der Liganden angepasst). Von C-RAF und Tau Protein wurden jeweils Peptidfragmente verwendet, die jeweils die Sequenz um die bekannten 14-3-3ζ-Bindungsmotive umfasste. Die Peptidfragmente von C-RAF und Tau Protein waren mit dem Fluorophor FAM-markiert, der während der Messung mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt werden kann und bei einer Wellenlänge von 535 nm emittiert.

Zuerst wurde der  $K_D$ -Wert (DMSO-Kurve, grün in Abbildung 49) der 14-3-3ζ-Wechselwirkung mit C-RAF bestimmt. Die ermittelte Bindungskonstante von  $K_D = 12.2 \mu\text{M}$  stimmt mit dem literaturbekannten Wert von  $16.7 \mu\text{M}$  (FP) überein.<sup>[258,259]</sup> Anschließend wurden die  $K_{Dapp}$ -Werte in Anwesenheit der multivalenten Liganden **57**, **58**, **59** und **45** ermittelt. Die Messung von Ligand **45** (dunkelblaue Kurve in Abbildung 49) ergibt einen scheinbaren  $K_{Dapp}$ -Wert von  $0.6 \mu\text{M}$ , d. h. die Bindungsaffinität von C-RAF zu 14-3-3ζ in Anwesenheit von **45** ist um das 20-fache gesteigert. Dies bedeutet folglich auch, dass es sich bei **45** um einen *Stabilisator* der 14-3-3ζ/C-RAF-Wechselwirkung handelt.



**Abbildung 49.** Halblogarithmische Auftragung der experimentell bestimmten Anisotropiewerte der Wechselwirkung von 14-3-3 $\zeta$  mit C-RAF in An- und Abwesenheit der multivalenten Liganden. Die Kontrolle (rechts) zeigt, dass **45** nicht mit C-RAF interagiert bzw. eine Interaktion unter den Meßbedingungen nicht angezeigt wird.

Die Wechselwirkung zwischen C-RAF und 14-3-3 $\zeta$  scheint durch die drei anderen Liganden der Serie kaum stabilisiert zu werden. Der Effekt ist deutlich geringer als bei **45**, wobei die gemessene Bindungskonstante von C-RAF und 14-3-3 $\zeta$  in Anwesenheit der Liganden **57**, **58** und **59** nur um das 1.4–1.7-fache verringert ist. Die genauen Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

**Tabelle 3.** Direkte Beeinflussung der Bindung von C-RAF an 14-3-3 $\zeta$  durch Multivalente Liganden,  $K_{\text{Dapp}}$ -Werte.

Ligand	C-RAF/14-3-3 $\zeta$ $K_D [\mu\text{M}]$	+ Ligand ( $c = 100 \mu\text{M}$ ) $K_{\text{Dapp}} [\mu\text{M}]$	Einfluss-Faktor
DMSO	$12.2 \pm 3.5$		
57		$8.9 \pm 3.4$	1.4
58		$7.3 \pm 1.4$	1.7
59		$7.6 \pm 1.9$	1.6
45		$0.6 \pm 0.2$	20

Demnach sind dennoch alle vier Liganden Stabilisatoren der C-RAF/14-3-3 $\zeta$ -Wechselwirkung. Verglichen mit dem einarmigen Liganden **57** ist der  $K_{\text{Dapp}}$ -Wert des vierarmigen Liganden **45** ca. um den Faktor 15 verringert, bedingt durch multivalente Effekte. Die Kontrolle zeigt, dass Ligand **45** unter den verwendeten Assaybedingungen nicht mit C-RAF interagiert. Es wurde ebenfalls getestet,

ob DMSO, in dem die Liganden gelöst sind, Einfluss auf die Bindung nimmt (Daten nicht gezeigt). Ohne DMSO konnte für C-RAF und 14-3-3ζ ein  $K_D$ -Wert von 9.9  $\mu\text{M}$  bestimmt werden und in Gegenwart von 1 % DMSO wurde ein  $K_D$ -Wert von 10.1  $\mu\text{M}$  ermittelt. Folglich nimmt die geringe Menge an DMSO keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung der Proteine.

Des weiteren wurden die  $\text{EC}_{50}$ -Werte für die Interaktion der multivalenten Liganden **57**, **58**, **59** und **45** mit den Komplexen aus 14-3-3ζ/C-RAF und 14-3-3ζ/Tau Protein bestimmt (Abbildung 50). C-RAF ist kleiner als Tau Protein und bindet an ein 14-3-3ζ-Monomer, während Tau Protein an das 14-3-3ζ-Dimer bindet. Da es sich bei den Liganden um Stabilisatoren der 14-3-3ζ-Wechselwirkung handelt, wurde der Assay der Untersuchung von Stabilisatoren angepasst. Dabei wurden wie oben beschrieben die Bedingungen so gewählt, dass die Anfangskonzentrationen von 14-3-3ζ und des Partnerpeptids unterhalb deren jeweiliger Bindungskonstante lag, damit keine messbaren Wechselwirkungen von 14-3-3ζ mit dem jeweiligen Partnerpeptid stattfinden.

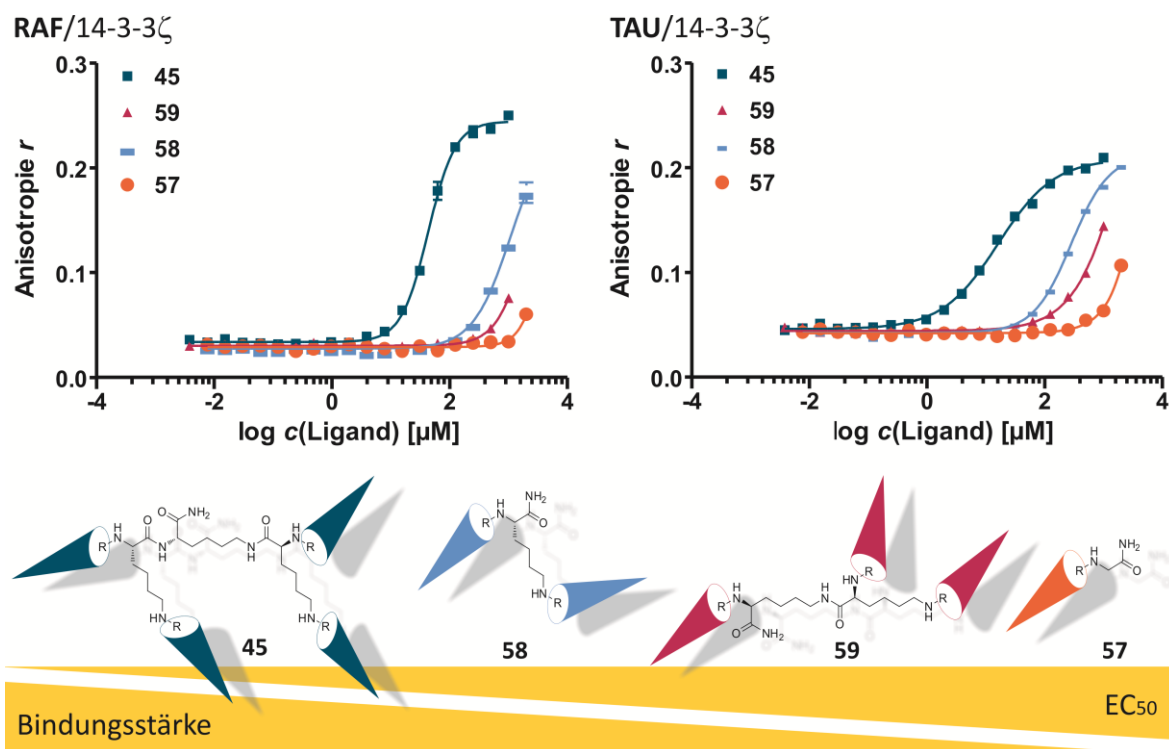


Abbildung 50. FP-Assay. Bindung der multivalenten Liganden an den Komplex aus 14-3-3ζ und C-RAF bzw. Tau Protein.

Die höchste verwendete Konzentration des Liganden hing von dessen Löslichkeit in DMSO ab und konnte zwischen 1–10 mM variieren. Die Messungen wurden jeweils 3-fach durchgeführt. Im Falle von **45** wurden zusätzlich Messungen an drei weiteren Tagen durchgeführt und dann der Mittelwert aller Messungen bestimmt. Die FP-Methode wies eine hervorragende Reproduzierbarkeit auf: die Varianz des Mittelwertes beträgt etwa 10 %. Bei der C-RAF/14-3-3ζ-Wechselwirkung konnte unter den gewählten Bedingungen nur für Ligand **45** ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert ermittelt werden (47.3  $\mu\text{M}$ ). *Ottmann et al.* bestimmten für Cotylenin A einen  $\text{EC}_{50}$ -Wert von

257  $\mu\text{M}$  für die Wechselwirkung mit dem gleichen C-RAF-Fragment, allerdings wurde 14-3-3 $\zeta$  His6-getaggt verwendet.<sup>[307]</sup> Verglichen mit Cotylenin A zeigt Ligand **45** eine deutlich höhere Bindungsaffinität für den Komplex aus C-RAF und 14-3-3 $\zeta$ .

Ligand **45** zeigt mit einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 16.1  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine gute Affinität zu dem Tau Protein/14-3-3 $\zeta$ -System. Unter den Assaybedingungen kann keine Wechselwirkung der Liganden **57** und **59** mit Tau Protein/14-3-3 $\zeta$  festgestellt werden. Interessanterweise zeigt wiederum die 2-armige Verbindung **58** einen Effekt auf die PPI. Dabei liegt der Wert mit 284.5  $\mu\text{M}$  aufgrund multivalenter Effekte um das 18-fache höher als der Wert für Ligand **45**. Daneben stabilisiert **58** nur die Wechselwirkung von 14-3-3 $\zeta$  mit Tau und nicht mit C-RAF, was darauf hindeutet, dass der Ligand hier bevorzugt die 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung beeinflusst. Insgesamt weist der vierarmige Ligand das größte Potential auf, sowohl den Komplex aus C-RAF/14-3-3 $\zeta$  als auch Tau Protein/14-3-3 $\zeta$  zu stabilisieren. Die Zahlenwerte zu den Messungen finden sich in Tabelle 4.

Für die 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung konnte bisher kein Stabilisator in der Literatur gefunden werden. Daher werden an dieser Stelle zwei der ersten bekannten Stabilisatoren der 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung vorgestellt.

**Tabelle 4.**  $\text{EC}_{50}$ -Werte der multivalenten Liganden **57**, **58**, **59** und **45**.

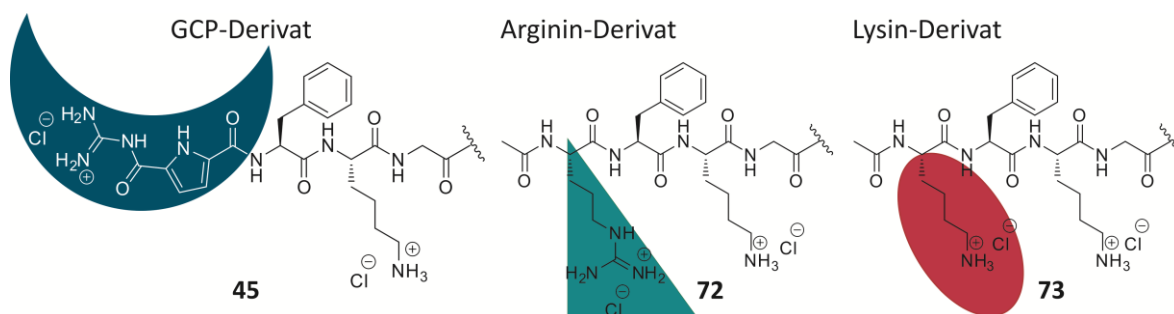
Ligand	C-RAF/14-3-3 $\zeta$ $\text{EC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Tau Protein/14-3-3 $\zeta$ $\text{EC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>57</b>	>2000	>2000
<b>58</b>	>1000	284.5 $\pm$ 27.7
<b>59</b>	>1000	>1000
<b>45</b>	47.3 $\pm$ 3.9	16.1 $\pm$ 1.9

Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass die multivalenten Liganden eine neue Verbindungsklasse von Stabilisatoren für PPI sind. Da sich die Verbindungen durch das verwendete Grundgerüst und somit durch ihre Bindungsalenz unterscheiden, ist der Unterschied im Stabilisierungsverhalten der Liganden auf den multivalenten Effekt zurückzuführen. Der Stabilisierungsprozess wird also durch die Anzahl der Arme signifikant beeinflusst.

#### 4.2.2. GCP im Vergleich mit den natürlichen Aminosäuren Arginin und Lysin

Um herauszufinden ob die Bindungsaffinität eines Liganden durch das maßgeschneiderte Bindungsmotiv GCP gesteigert werden kann, wurden Verbindungen untersucht, die terminal entweder Arginin- (**72**) oder Lysin-Reste (**73**) anstelle von GCP aufweisen und somit analog zu dem

schon vorher beschriebenen Stabilisator **45** aufgebaut sind (Abbildung 51). Die Synthesen der Verbindungen wurden in Teil 4.1.4 vorgestellt.



**Abbildung 51.** Die vierarmige Liganden (GKFR)<sub>4</sub> (**72**) und (GKFK)<sub>4</sub> (**73**) sind analog zu (GKF-GCP)<sub>4</sub> (**45**) aufgebaut; abgebildet sind jeweils die Seitenarmsequenzen.

#### 4.2.2.1. Fluoreszenzpolarisations-Messungen

Zum Einfluss der Liganden auf die 14-3-3ζ Bindung mit C-RAF und Tau Protein, wurden ebenfalls FP-Experimente durchgeführt. Für die direkte Interaktion von 14-3-3ζ und C-RAF wurde eine Bindungskonstante von  $K_D = 9.4 \mu\text{M}$  bestimmt. Anschließend wurde die scheinbare  $K_{Dapp}$  in Anwesenheit von  $100 \mu\text{M}$  der Liganden **45**, **72** und **73** gemessen. **45** zeigt eine signifikante Verringerung des  $K_D$ -Werts der mit  $0.60 \mu\text{M}$  ca. 16-fach niedriger ist als die direkte Bindungskonstante, die für 14-3-3ζ und C-RAF gemessen wurde. Das Arginin-Derivat (**72**) zeigt eine kaum verringerte Bindungskonstante. Der scheinbare  $K_D$ -Wert liegt mit  $6.5 \mu\text{M}$  1.4-fach niedriger. Die Lysinverbindung (**73**) zeigt sogar einen leicht erhöhten Wert was sogar auf einen destabilisierenden Effekt hindeuten könnte. Die  $K_{Dapp}$  ist mit  $13.7 \mu\text{M}$  1.5-fach höher als die direkte Bindungskonstante. Die Werte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

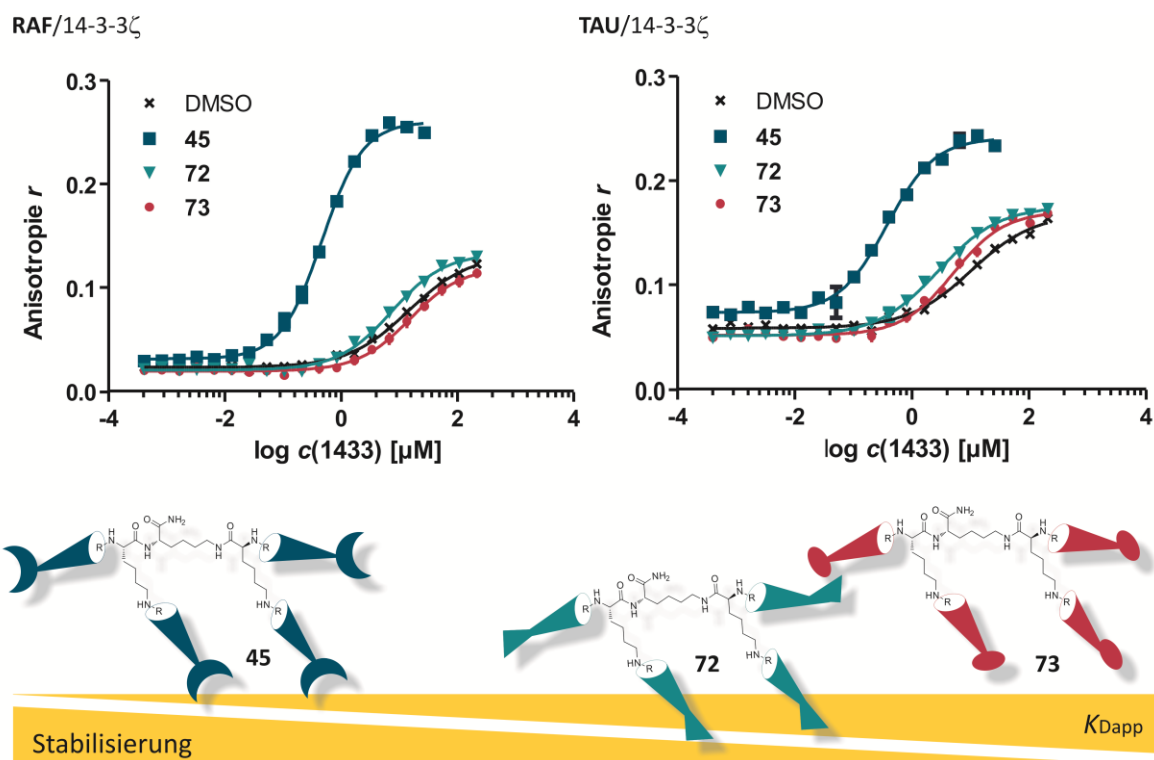
**Tabelle 5.** Direkte Beeinflussung der Bindung von C-RAF und 14-3-3ζ;  $K_{Dapp}$  Werte der Liganden **45**, **72** und **73**.

Ligand	C-RAF/14-3-3ζ $K_D [\mu\text{M}]$	+ Ligand ( $c = 100 \mu\text{M}$ ) $K_{Dapp} [\mu\text{M}]$	Einfluss-Faktor
DMSO	$9.4 \pm 2.7$		
<b>45</b>		$0.6 \pm 0.1$	15.7
<b>72</b>		$6.5 \pm 1.1$	1.5
<b>73</b>		$13.7 \pm 3.4$	1.5

Zudem wurde der Einfluss der Liganden auf die Interaktion von 14-3-3ζ mit Tau Protein untersucht und auch hier die scheinbaren  $K_D$ -Werte mittels FP bestimmt (Abbildung 52). Es zeichnet



sich der gleiche Trend ab: das GCP-Derivat zeigt den größten Effekt auf die Bindung mit einer 13-fach niedrigeren (von 5.4  $\mu\text{M}$  auf 0.4  $\mu\text{M}$ )  $K_{\text{Dpp}}$ .



**Abbildung 52.** FP-Untersuchung der Wechselwirkung von 14-3-3 $\zeta$  mit C-RAF (links) und Tau Protein (rechts) in An- und Abwesenheit der vierarmigen Liganden **45**, **72** und **73**. Ligand **45** weist jeweils den kleinsten scheinbaren  $K_{\text{Dpp}}$ -Wert auf und hat somit den größten stabilisierenden Effekt auf die Wechselwirkungen.

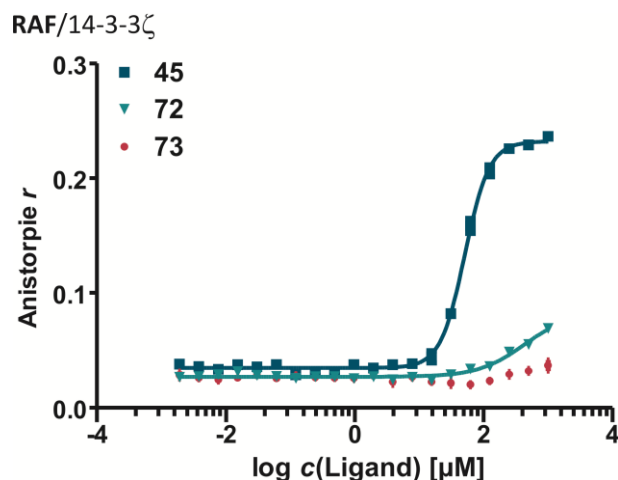
Das Arginin-Derivat zeigt wieder einen leicht stabilisierenden Effekt (2.4-fach,  $K_{\text{Dpp}} = 2.3 \mu\text{M}$ ) und für die Lysin-Verbindung kann gar kein Effekt beobachtet werden; die scheinbare  $K_{\text{Dpp}}$  ist mit 5.2  $\mu\text{M}$  fast identisch mit der direkten Bindungskonstanten.

**Tabelle 6.** Direkte Beeinflussung der Bindung von Tau Protein und 14-3-3 $\zeta$ ;  $K_{\text{Dpp}}$ -Werte der Liganden **45**, **72** und **73**.

Ligand	Tau Protein/14-3-3 $\zeta$ $K_D [\mu\text{M}]$	+ Ligand ( $c = 100 \mu\text{M}$ ) $K_{\text{Dpp}} [\mu\text{M}]$	Einfluss-Faktor
DMSO	5.4 $\pm$ 1.6		
<b>45</b>		0.4 $\pm$ 0.1	13.5
<b>72</b>		2.3 $\pm$ 0.4	2.4
<b>73</b>		5.2 $\pm$ 1.0	gleich

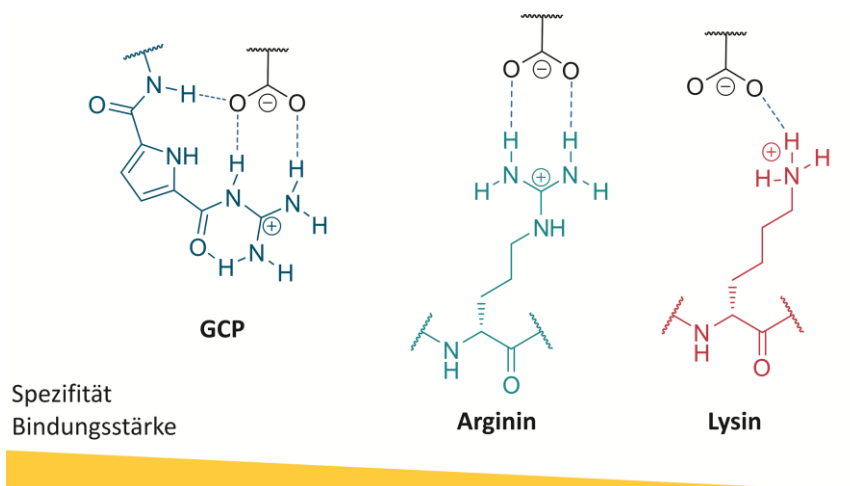
Diese Beobachtung passt auch zu den Ergebnissen der  $\text{EC}_{50}$ -Bestimmungen mit 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF. Nur für **45** lässt sich ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert bestimmen, der mit 47  $\mu\text{M}$  moderat ist. Es zeigt sich, dass **73** und **72** unter den Assaybedingungen praktisch nicht an den Komplex aus 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF

binden. Für **73** konnte unter den Assaybedingungen keine Interaktion festgestellt werden. Die angewendeten Konzentrationen von **72** scheinen zu niedrig zu sein, um einen merkbaren Einfluss auf die Bindungsaffinität von 14-3-3ζ auf C-RAF auszuüben (Abbildung 53).



**Abbildung 53.** Die  $EC_{50}$ -Werte von **45**, **72** und **73** wurden mittels FP bestimmt.

Dies führt zum Schluss, dass die Liganden, die die natürlichen Aminosäuren Arginin oder Lysin tragen, kaum dazu in der Lage sind die 14-3-3ζ/Peptid-Komplexe zu stabilisieren. Der Ligand mit dem Oxo-Anionenbindungsmotiv ist beiden klar überlegen. Somit kann erstmals der Einfluss eines künstlichen Bindungsmotivs auf die Stabilisierung von PPI nachgewiesen werden. Die Ammoniumgruppe des Lysins bildet unspezifische Salzbrücken aus. Arginin kann zusätzlich über seine Guanidinium-Gruppe bidentate Wasserstoffbrücken ausbilden, wobei sich Guanidinium und Carboxylat nahezu co-planar anordnen, wodurch die Bindung stärker gerichtet wird. Die GCP-Gruppe kombiniert ein wohlorganisiertes Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit elektrostatischen Interaktionen (Abbildung 54). Daher ist die Anordnung dieser Gruppe für die Komplexierung von Carboxylaten und anderen Oxoanionen optimiert.<sup>[517–519]</sup> Somit ist das GCP-Bindungsmotiv, das gezielt Bindungen ausbilden kann, in der Lage die Stabilisierung dramatisch zu verbessern.



**Abbildung 54.** GCP-Interaktionsnetzwerk im Vergleich mit Arginin und Lysin.

#### 4.2.2.2. Einfluss des Protonierungsgrads

Wie schon die FP-Untersuchungen gezeigt haben, ist das GCP-Derivat denen überlegen, die die natürlichen Aminosäuren Arginin und Lysin tragen. Um genauer zu verstehen, wie GCP unter realen Bedingungen vorliegen könnte, also ob unter den Bedingungen wirklich eine Kombination aus elektrostatischen Interaktionen und dem organisierten Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk besteht, wurden die  $pK_s$ -Werte der verschiedenen Liganden bestimmt. Die  $pK_s$ -Werte der einzelnen funktionellen Gruppen geben darüber Aufschluss, ob die betrachtete Einheit unter den Mess- und Analysebedingungen protoniert, deprotoniert oder neutral vorliegt. Dafür wurde von jeder Verbindung eine Stammlösung von 10 mM in  $H_2O$  hergestellt, auf 0.1 mM verdünnt und einhergehend mit der *Halb-Äquivalent Methode* entsprechende Mengen einer 0.1 M NaOH-Lösung (0.5 Äq. pro erster funktionelle Gruppe, z. B. GCP) hinzugegeben und der jeweilige pH-Wert gemessen. Der zweite  $pK_s$ -Wert wurde bestimmt, indem ein weiteres Äquivalent pro zweiter funktioneller Gruppe (z. B. Lysin) der NaOH-Lösung zu der Verbindung gegeben wurde und danach ebenfalls der pH-Wert gemessen wurde. Da unter diesen Bedingungen gilt, dass die Konzentrationen protonierter und deprotonierter Verbindung gleich ist, kann der *Henderson-Hasselbalch-Gleichung* folgend angenommen werden, dass  $pH = pK_s$  ist.

$$pH = pK_s - \lg \frac{c(HA)}{c(A^-)} \quad (6)$$

Die gemessenen  $pK_s$ -Werte repräsentieren dann jeweils den Mittelwert für die jeweilige funktionelle Gruppe, da die Werte nicht für jeden Arm der multivalenten Liganden einzeln bestimmt werden können. In Tabelle 7 sind die gemessenen  $pK_s$ -Werte für verschiedene Liganden aufgelistet.

**Tabelle 7.** Ermittelte  $pK_s$ -Werte.

Ligand	$pK_{s1}$	$pK_{s2}$
<b>57</b>	6.65	9.17
<b>58</b>	6.59	9.47
<b>59</b>	6.86	9.77
<b>45</b>	6.58	9.81
<b>72</b>	9.94	10.50
<b>73</b>	9.04	10.06

Für die verschieden-armigen Liganden **57**, **58**, **59** und **45** kann jeweils der gemessene  $pK_{s1}$ -Wert der GCP-Gruppe zugeordnet werden. Die Werte reichen von 6.6–6.9 und stimmen mit dem mittels pH-abhängiger UV-Resonanz-Raman-Streuung von *Schlücker et al.* bestimmten  $pK_s$ -Wert der GCP-Untereinheit von 6.55 überein.<sup>[27,520]</sup> Der zweite  $pK_s$ -Wert von 9.2–9.8 kann Lysin zugeordnet werden, der etwas niedriger als der Literaturwert von 10.5 ist.<sup>[225]</sup> Ligand **73** weist zwei  $pK_s$ -Werte

in diesem Bereich auf, die der Struktur entsprechend den beiden Lysinen der Seitenketten zugewiesen werden. Für das Arginin-Derivat **72** konnten  $pK_s$ -Werte von 9.9 und 10.5 bestimmt werden, die ebenfalls niedriger als die Literaturwerte für Lysin (10.5<sup>[225]</sup>) und Arginin (12.5<sup>[225]</sup> bzw. 13.8<sup>[11]</sup>) ausfallen. Arginin und Lysin liegen demzufolge unter physiologischen pH-Wert vollständig protoniert vor. Um dies genauer zu ermitteln, wurden im einzelnen die Protonierungsgrade (PG) der betrachteten funktionellen Gruppen bei verschiedenen pH-Werten durch Umformen von Gleichung 6 berechnet. So zeigt sich, dass die GCP-Einheit in Verbindung **45** tatsächlich bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 nur zu knapp 13 % protoniert vorliegt. Unter Berücksichtigung, dass die Lysine vollständig protoniert vorliegen, ergeben sich für den Liganden **45** also nur 4.5 positive Ladungen von 8 möglichen protonierbaren funktionellen Gruppen entsprechende einer Protonierung von 56 %. Vergleicht man die multivalenten GCP-tragenden Liganden weist nur Ligand **59** einen PG von über 20 % auf und somit einer gesamt Protonierung von über 60 % auf. Die Liganden liegen somit unvollständig protoniert vor (PG bei pH 7.4 zwischen 56 und 62 %). Die PG der GCP-Gruppe bei verschiedenen pH-Werten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8.** Protonierungsgrade (PG) bei verschiedenen pH-Werten.

Ligand	$pK_{s1}$ -Wert	PG bei pH 7.4 [%]	PG bei pH 7.5 [%]	PG bei pH 6.5 [%]	PG bei pH 4.9 [%]
<b>45</b>	6.58	13	11	56	98
<b>59</b>	6.86	22	19	70	99
<b>58</b>	6.59	13	11	56	98
<b>57</b>	6.65	15	12	60	98

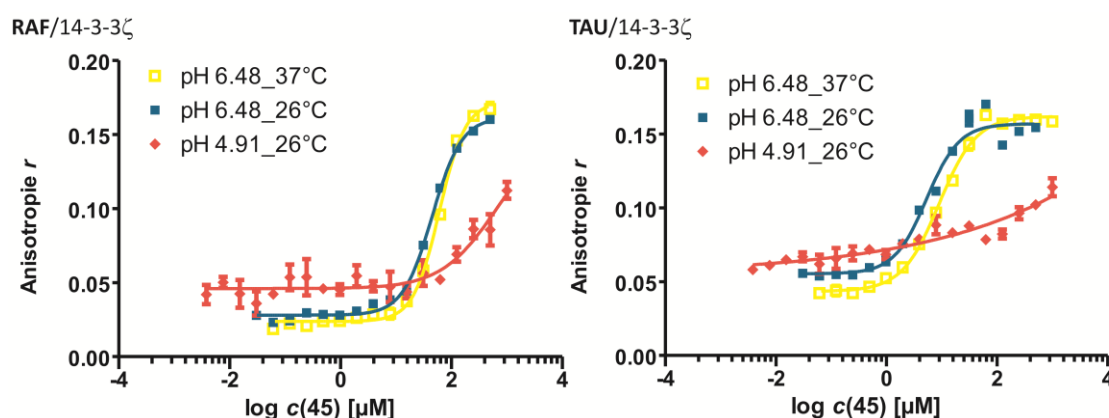
Die Liganden **73** und **72** sind im Vergleich zu **45** vollständig protoniert und weisen aber kaum stabilisierende Eigenschaften in den FP-Experimenten auf. Gleichwohl zeigt **45** die stärkste Bindung sowohl an den Komplex aus 14-3-3ζ und C-RAF als auch Tau Protein. GCP liegt unter physiologischen pH-Wert deprotoniert vor, wodurch keine elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Guanidium-Gruppe und Carboxylat-Resten auftreten kann, und die Erkennung von Anionen ist hauptsächlich auf die Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerks zurückzuführen.

Um zu testen, ob ein höherer Protonierungsgrad abträglich für Bindung und Stabilisierung ist, wurden die  $EC_{50}$ -Werte von **45** nochmal bei niedrigeren pH-Werten bestimmt. Bei einem pH-Wert von 6.5 weist die GCP-Einheit von **45** einen PG von 56 % auf und somit liegt Ligand **45** gesamt mit 6.2 von 8 protonierten Stellen (78 %) protoniert vor. Die Werte bei pH 6.5 und pH 7.5 zeigen für beide 14-3-3ζ-Wechselwirkungen einen leichten Unterschied (s. a. Tabelle 9).

**Tabelle 9.** EC<sub>50</sub>-Werte von Ligand **45** bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen.

Bedingungen		C-RAF/14-3-3ζ EC <sub>50</sub> [μM]	Tau Protein/14-3-3ζ EC <sub>50</sub> [μM]
pH-Wert	T [°C]		
4.9	26	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
6.5	26	45.0 ± 3.3	5.3 ± 0.9
6.5	37	60.6 ± 4.6	8.9 ± 0.9
7.5	25	47.3 ± 3.9	16.1 ± 1.9

Wiederholt man die Messung im schwach sauren Bereich bei pH 4.9 können die Messungen nicht mehr ausgewertet werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Proteinstruktur bei diesem pH-Wert ebenfalls verändert sein kann und somit nicht unterschieden werden kann, ob die verminderte Stabilisierung an der Protonierung von Ligand **45** oder an einem eventuell veränderten/denaturierten 14-3-3ζ-Protein liegt.

**Abbildung 55.** FP-Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen.

Die höhere Protonierung von **45** wirkt sich somit nicht auf die Bindungsaffinität aus. Zusätzlich wurde die Messung bei pH 6.5 auch bei physiologischer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Bindungsaffinität von **45** ist mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 61 μM für den 14-3-3ζ/C-RAF-Komplex geringfügig schlechter; für den 14-3-3ζ/Tau Protein-Komplex ist kein Unterschied feststellbar. Ein Temperaturunterschied von 10 °C nimmt somit keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsereignisse.

Es konnte somit gezeigt werden, dass unter den hier gewählten Bedingungen die GCP-Gruppe nur über das wohl-organisierte Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk, nicht aber elektrostatisch, mit den Carboxylaten wechselwirkt. Im Gegensatz zu GCP liegen sowohl Arginin als auch Lysin unter den Assay-Bedingungen protoniert vor. Da die beiden Arginin- und Lysin tragenden Liganden **72** und **73** die 14-3-3ζ-Wechselwirkung kaum beeinflussen, scheint die Ausbildung elektrostatischer

Wechselwirkungen nicht ausreichend für eine Interaktion mit den Proteinkomplexen zu sein, wie es schon mittels der FP-Messungen gezeigt werden konnte. Einzig der GCP-tragende Ligand **45** stabilisiert die Komplexe aus 14-3-3ζ mit C-RAF bzw. Tau Protein, wobei nun nachgewiesen werden konnte, dass die Bindungsaffinität von **45** an die jeweiligen Komplexe nur durch das Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk der GCP-Gruppe vermittelt wird.

#### 4.2.2.3. Einfluss der Peptidsequenz

Als weitere Variation wurde die Peptidsequenz der Seitenarme ausgehend von **45** verändert (Abbildung 56), um festzustellen wie sich eine Sequenz-Veränderung in der näheren Umgebung zu GCP auf die Stabilisierung auswirkt. Dafür wurde in der Seitenkettensequenz die Reihenfolge der Aminosäuren Lysin und Phenylalanin vertauscht (Ligand **62**). Da das Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk für das Bindungsereignis von Bedeutung ist, wurde die Aminosäure Phenylalanin gegen Tryptophan ausgetauscht (Ligand **76**), da Tryptophan über sein Indol-NH zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Zu Vergleichszwecken wurde hier wiederum ein Arginin-Derivat (Ligand **75**) untersucht, das hier analog zu **76** ist. Mit den neuen Liganden wurden ebenfalls FP-Experimente durchgeführt.

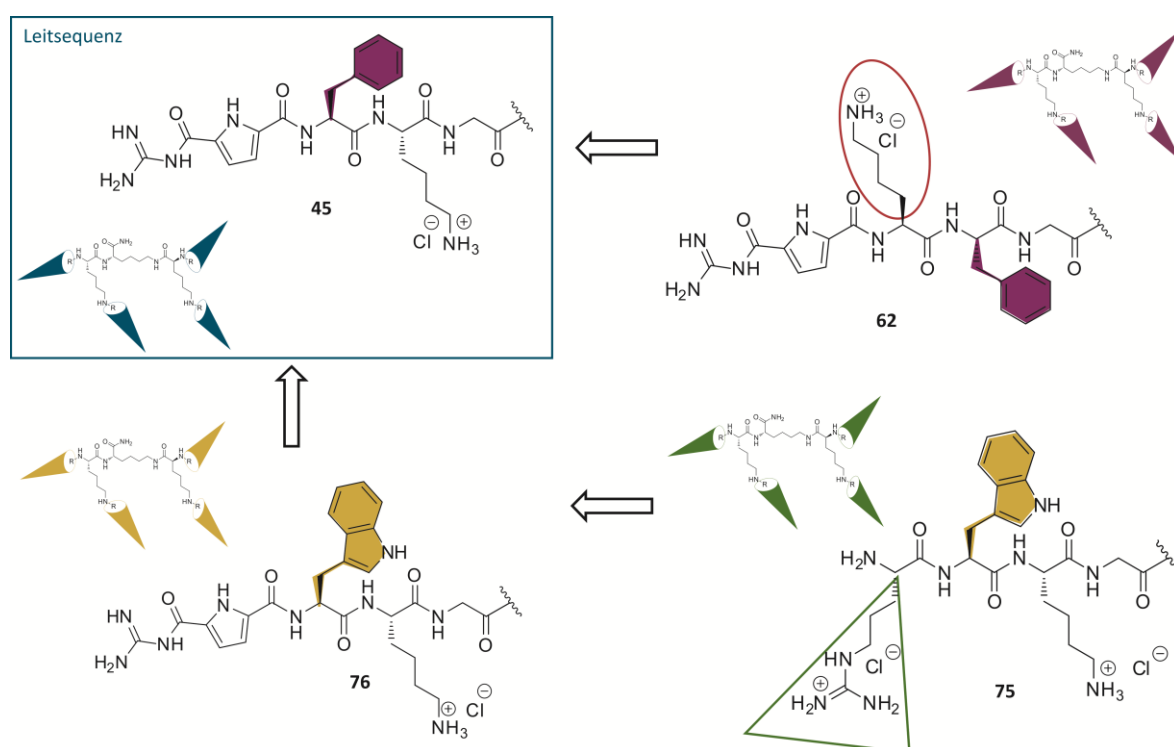
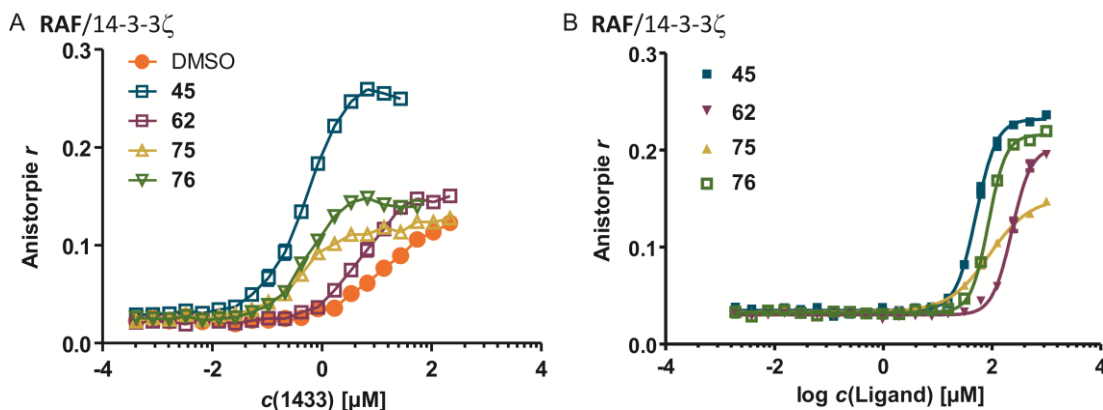


Abbildung 56. Liganden mit veränderter Peptidsequenz.

Der Proteinkomplex aus C-RAF und 14-3-3ζ weist in Gegenwart von Ligand **62** einen scheinbaren  $K_D$ -Wert von 5.7  $\mu\text{M}$  auf, d. h. der Komplex wird leicht stabilisiert. Die Bindungsaffinität an den Komplex ( $\text{EC}_{50} = 231.5 \mu\text{M}$ ) ist verglichen mit der Affinität von **45** allerdings 5-fach verringert

und reflektiert den Positionswechsel von Lysin und Phenylalanin. Es ist naheliegend, die Affinitätserniedrigung auf die Positionsänderung von Lysin und GCP zurückzuführen, die Einfluss auf die Konformation des Liganden nehmen könnte.



**Abbildung 57.** FP-Experimente: A) Bestimmung der scheinbaren  $K_{Dapp}$ -Werte. B) Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte.

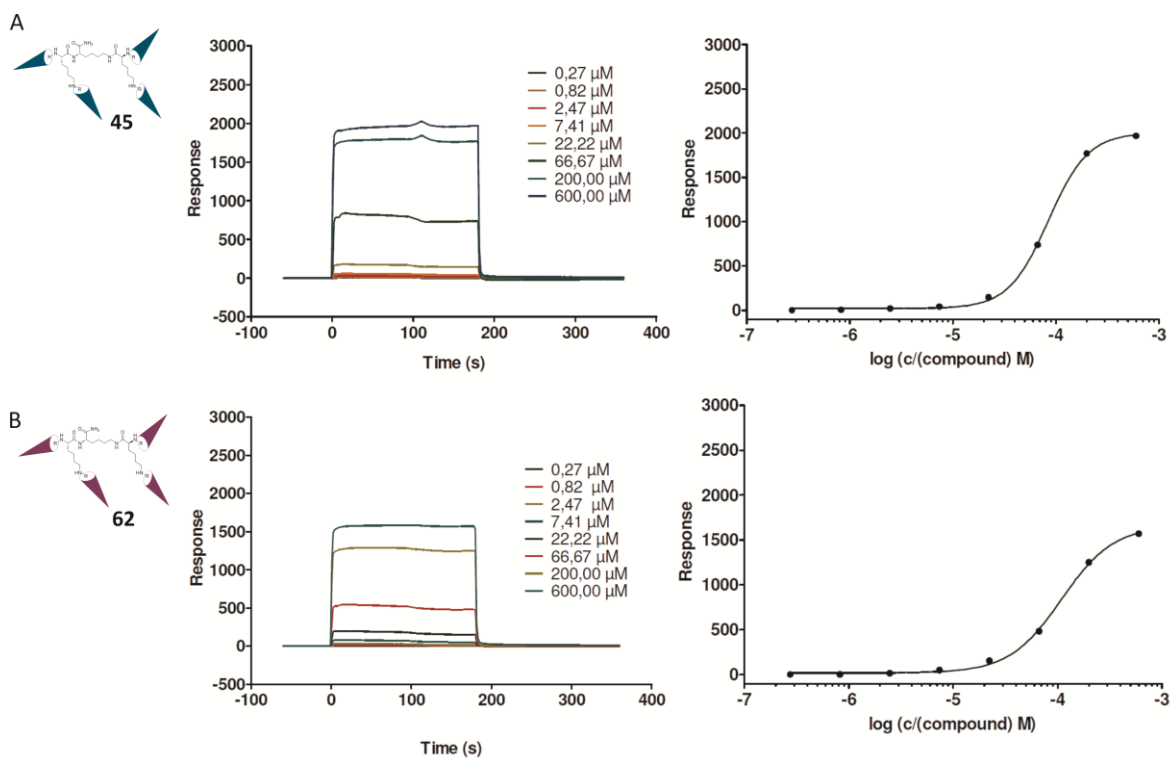
Wird die benachbarte Aminosäure Phenylalanin gegen Tryptophan ausgetauscht, kann der stabilisierende Effekt leicht gesteigert werden. Ligand **75** bindet an den Komplex von C-RAF und 14-3-3ζ mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 89.8  $\mu M$  und die Affinität von C-RAF an 14-3-3ζ ist um das 18-fache erhöht. Tryptophan ist verglichen mit Phenylalanin größer, polarer und kann neben hydrophoben Wechselwirkungen auch über die Seitenkette Wasserstoffbrücken ausbilden. Tatsächlich scheint hier durch die Eigenschaften des Tryptophans die Bindungsaffinität von C-RAF an 14-3-3ζ positiv beeinflusst zu werden. Interessanterweise scheint dagegen der Einfluss der GCP-Einheit in Anwesenheit von Tryptophan in der Seitenkettensequenz verringert zu sein, da das entsprechende GCP-Derivat **76** ähnlichen Einfluss auf die 14-3-3ζ/C-RAF-Stabilisierung nimmt wie **45**.

**Tabelle 10.** Direkte Beeinflussung der Bindung von C-RAF und 14-3-3ζ;  $K_{Dapp}$ -Werte der Liganden **45**, **62**, **75** und **76**.

Ligand	FP C-RAF/14-3-3ζ $K_D [\mu M]$	+ Ligand ( $c = 100 \mu M$ ) $K_{Dapp} [\mu M]$	Einfluss-Faktor	FP C-RAF/14-3-3ζ $EC_{50} [\mu M]$	SPR 14-3-3 $K_D [\mu M]$
DMSO	9.4 ± 2.7				
45		0.6 ± 0.1	15.7	47.3 ± 3.9	124
62		5.7 ± 0.7	1.6	231.5 ± 13.8	162
75		0.5 ± 0.1	18.8	89.8 ± 15.5	-
76		0.6 ± 0.1	15.7	86.2 ± 1.0	-

Der Aufbau der Seitenarmsequenz scheint somit ebenfalls die Stabilisierung zu beeinflussen. Der Einbau von Wasserstoffbrückenbindungen bildenden Aminosäuren wie Tryptophan scheint für die stabilisierenden Eigenschaften der Liganden von Vorteil zu sein.

Bisher unberücksichtigt blieb die Frage wie die Liganden direkt an 14-3-3ζ binden, also in Abwesenheit der Partnerpeptide. Diese Untersuchung ist mittels FP nicht möglich. Daher wurden die Bindungskonstanten von **45** und **62** an 14-3-3ζ mittels Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten (*surface plasmon resonance*, SPR) von Maria Bartel aus dem Arbeitskreis von Christian Ottmann an der TU Eindhoven bestimmt. Mit dieser Methode können biologische (aber auch andere) Wechselwirkung untersucht werden, indem dynamische Oberflächenprozesse wie Adsorption und Desorption beobachtet werden. Für das Experiment wurde Streptavidin auf einen Goldchip aufgetragen. Biotin ist dafür bekannt ein sehr starker Bindungspartner ( $K_D = 4 \times 10^{-14} \text{ M}$ <sup>[521]</sup>) von Streptavidin zu sein. Biotinyliertes 14-3-3ζ kann somit auf der Oberfläche des Goldchips über die Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung immobilisiert werden. Im Experiment wird in einem Mikrofluidsystem ein potentieller Bindungspartner von 14-3-3 injiziert. Ein Oberflächensensor erkennt die Gewichtszunahme, die durch ein Bindungsereignis verursacht wird, und das Signal steigt an. Die Dissoziation wird durch eine zweite Injektion von Puffer eingeleitet, wodurch das Signal wieder in den Grundstatus zurückkehrt. Die SPR-Sensogramme von **45** und **62** sind in Abbildung 58 abgebildet, wobei die Messung jeweils einfach erfolgte. Daraus wurden Bindungskonstanten von 124 μM für Ligand **45** und 162 μM für **62** ermittelt.



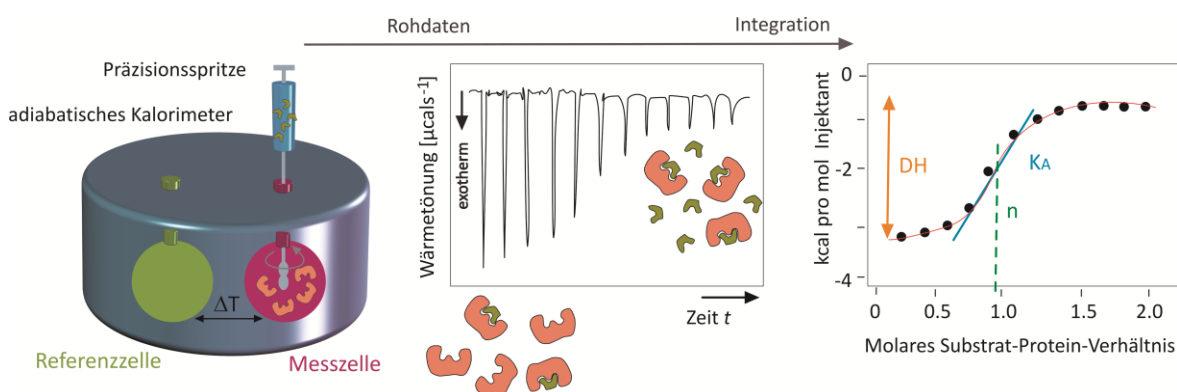
**Abbildung 58.** SPR Untersuchung: Darstellung der Sensogramme der Bindung von A) **45** und B) **62** jeweils an 14-3-3ζ.



Dies bedeutet für **45**, dass die Bindungsaffinität an 14-3-3 geringer ist als an den Komplex ( $EC_{50} = 47 \mu\text{M}$ ). Bei **62** deuten die Experimente darauf hin, dass dies genau umgekehrt ist. Die Bindungsaffinität an den Komplex ist um den Faktor 1.4 reduziert ( $EC_{50} = 231 \mu\text{M}$ ), obwohl die Messung der scheinbaren Bindungskonstanten darauf hindeutet, dass **62** ebenfalls den Komplex geringfügig (Faktor 1.6) stabilisiert. Dieses Verhalten scheint nur auf den Positionswechsel von Phenylalanin und Lysin zurückzuführen zu sein. *Bartel* stellte die Hypothese auf, dass die Bindung der Liganden nicht an den N-Terminus von 14-3-3 $\zeta$  erfolgen kann, da hier die Biotinylierung erfolgte.<sup>[522]</sup> Da dies jedoch erste Untersuchungen zu der direkten Bindung der Liganden an 14-3-3 sind, sollten die Experimente wiederholt werden, um tatsächlich Aussagekraft zu besitzen. Um dies mit einer anderen Methode zu untersuchen und weitere Einblicke in den Bindungsprozess von **45** an 14-3-3 $\zeta$  zu erlangen wurden ITC-Experimente durchgeführt.

#### 4.2.2.4. ITC-Messungen

Mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) können neben der Bestimmung von Bindungskonstanten auch thermodynamische Informationen, wie Enthalpie- und Entropiewerte, erhalten werden, die einen tieferen Einblick in den Bindungsprozess erlauben. Das Messprinzip beruht auf der Erfassung von Temperaturänderungen während eines Bindungsereignisses zwischen (Bio)molekülen, bei dem entweder Wärme abgegeben oder verbraucht wird. Eine Substanzlösung wird hierfür zu einer Proteinlösung in der Messzelle mit exakten Aliquoten titriert. In Abbildung 59 ist ein schematischer Aufbau und Ablauf einer ITC-Messung wiedergegeben. Wenn eine Bindung erfolgt, wird ein Temperaturunterschied zwischen Messzelle und einer Referenzzelle festgestellt, und die Temperatur der Messzelle wird durch das Kalorimeter gegenreguliert, um den Unterschied zu kompensieren.



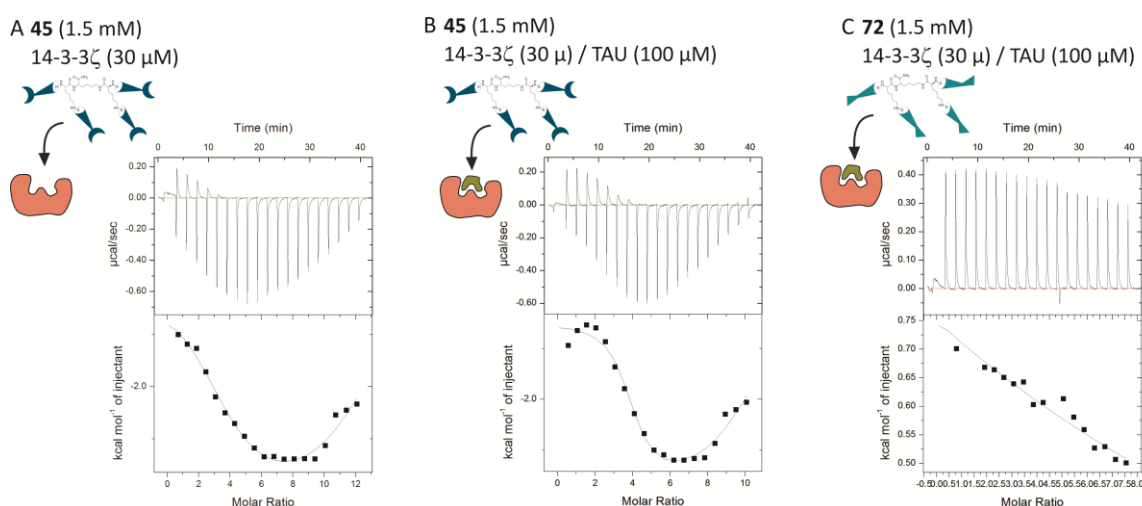
**Abbildung 59.** Schematischer Aufbau eines isothermen Kalorimeters. Über eine Präzisionspritze wird eine Substanzlösung zu einer, sich in einer Messzelle befindlichen Proteinlösung titriert. Durch die Bindung der Substanz an ein Protein wird Wärme abgegeben und diese Temperaturdifferenz detektiert und gegenreguliert. Im Verlauf der Titration ist das Protein durch die Substanz abgesättigt und keine Wärmetonung kann mehr erfasst werden. Die Isotherme ergibt sich aus den integrierten Peaks, die gegen das molare Verhältnis aus Substanz und Protein aufgetragen werden.

Zu Beginn der Titration liegt das Protein in der Messzelle im Überschuss vor und jedes Substanzmolekül liefert ein Bindungsereignis, das zur Wärmetönung beiträgt. Gegen Ende der Titration sind alle Proteine mit der Substanz abgesättigt und keine neuen Bindungsereignisse finden mehr statt. Demzufolge nimmt die Wärmetönung ab und nur noch die Verdünnung der Substanz wird gemessen, d. h. die gemessene Wärmemenge ist direkt proportional zum Bindungsereignis. Die so erfasste Wärmetönung wird als Funktion der Zeit wiedergegeben. Durch Integration der Peaks, die gegen das molare Verhältnis aus Substanz und Protein aufgetragen wird, ergibt sich die Isotherme. Daraus ermitteln sich direkt die Bindungsaffinität  $K_A$ , die Stöchiometrie  $n$  und die molare Bindungs-Enthalpie  $\Delta_B H$ , die der abgegebenen Wärmemenge pro Mol der gebundenen Substanz entspricht. Über die *Gibbs-Helmholtz*-Gleichung (8) lassen sich mit den gewonnen Daten die Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) und Entropie ( $\Delta S$ ) unter Einbeziehung der Temperatur  $T$ , bei der das Experiment durchgeführt wurde, berechnen.

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

Die ITC kann im Gegensatz zu den FP-Experimenten mit unmarkierten Verbindungen durchgeführt werden. Hier ergibt sich die Möglichkeit, auch auf die direkte Bindung von **45** an 14-3-3ζ zu schauen. Alle Experimente wurden in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM β-Mercaptoethanol) bei pH 7.5 und 25 °C durchgeführt. Die Kontrollexperimente sind im Anhang zu finden. Neben der Titration von **45** zu 14-3-3ζ, wurde unter gleichen Bedingungen die Titration von **45** zu einer vorgemischten Lösung aus 14-3-3ζ und Tau Protein durchgeführt. Beide Messungen zeigen ein ungewöhnliches Profil, dargestellt in Abbildung 60.

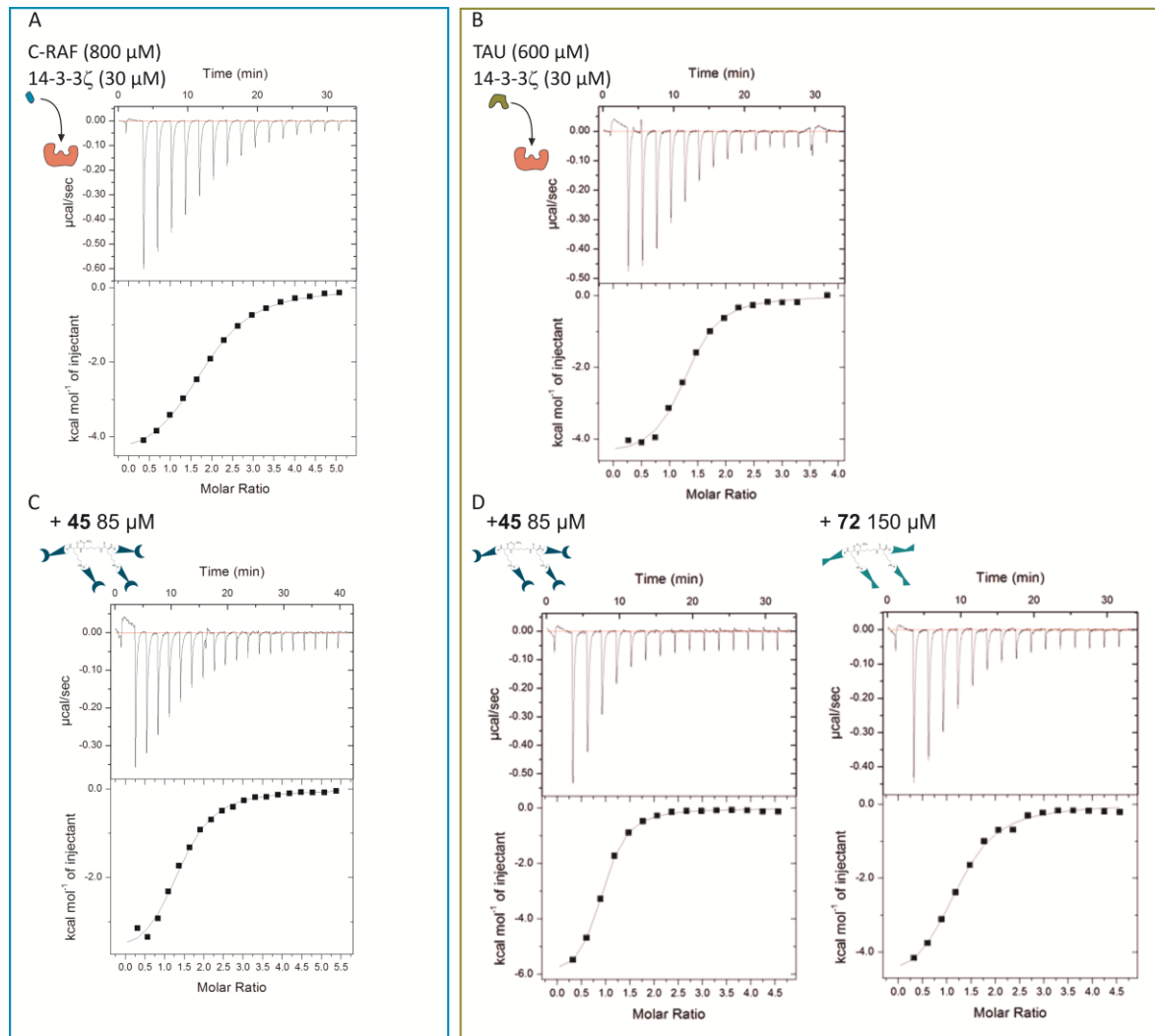


**Abbildung 60.** ITC-Titrationskurven von A) **45** zu 14-3-3ζ, B) **45** zu 14-3-3ζ/Tau Protein und C) **72** zu 14-3-3ζ/Tau Protein.

Die Form der Isothermen und die Tatsache, dass die Proben nach dem Experiment leicht getrübt waren, lassen auf einen komplexen Bindungsmechanismus schließen, der eine mehrfache Bindung von Liganden und eine anschließende oder parallel stattfindende unspezifische Aggregation nicht ausschließt, und durch simple Modelle nicht zufriedenstellend interpretiert werden kann. Aufgrund des Vorhandenseins einer Vielzahl negativ geladener Aminosäurereste an der Proteinoberfläche ist es durchaus möglich, dass mehrere Liganden an die Oberfläche eines oder mehrerer Proteine binden. Alternativ könnte bedingt durch die Bindung von **45** an das Protein durch eine Ladungskompensation die Löslichkeit des Komplexes im Puffer erniedrigt werden, wodurch es zur Präzipitation des Komplexes kommt. Eine aussagekräftige Untersuchung der direkten Bindung von **45** an 14-3-3 $\zeta$  und den Komplex aus 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein war somit nicht möglich. Das Arginin-Derivat **72** wurde ebenfalls zu einem Gemisch aus 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein titriert, wobei ein gänzlich anderes Profil erhalten wurde, das nur eine geringe endotherme Wärmetönung zeigt. Es konnte keine signifikante Bindung von **72** an den Komplex festgestellt werden, was wiederum zu den Ergebnissen der FP-Experimente passt. Da beide Liganden strukturell sehr ähnlich sind, kann das unterschiedliche Verhalten somit nur auf die GCP-Einheit zurückgeführt werden.

Um dennoch den Einfluss von **45** auf die 14-3-3 $\zeta$ -Wechselwirkungen untersuchen zu können, wurden die Bindungskonstanten der Peptidfragmente und 14-3-3 $\zeta$  in An- und Abwesenheit von **45** bestimmt. Die thermalen Titrationsdaten wurden mit einem *single-binding-site*-Modell angepasst, wobei der erste Punkt der initialen Injektion nicht berücksichtigt wurde, und die (scheinbare) Dissoziationskonstante ( $K_D$  bzw.  $K_{Dapp}$ ), Bindungs-Enthalpie ( $\Delta_b H$ ), Entropie ( $\Delta S$ ) und Stöchiometrie der Bindung ( $n$ ) wurden bestimmt. Abgebildet sind jeweils repräsentative Experimente. Die Verdünnungsenthalpien von C-RAF bzw. Tau Protein in Puffer und Puffer in 14-3-3 $\zeta$  wurden separat bestimmt und jeweils von den Titrationswerten der Bindungsexperimente abgezogen.

Die  $K_D$ -Werte betrugen für C-RAF 7.3  $\mu M$  und für Tau Protein 2.2  $\mu M$  und sind mit denen im FP-Experiment bestimmten Werten vergleichbar und konnten sehr gut reproduziert werden. Bei gleichen Messbedingungen wurde Ligand **45** mit 14-3-3 $\zeta$  in einem molaren Verhältnis von 2.8 : 1 vorgemischt. Die anwendbare Konzentration von **45** wurde dadurch limitiert, dass beim Mischen von **45** mit 14-3-3 $\zeta$  bei höheren Konzentrationen bzw. Verhältnissen durch Bildung eines weißen Niederschlages zu beobachten war. In Anwesenheit von **45** wurden scheinbare  $K_D$ -Werte von 5.5  $\mu M$  für die C-RAF- und 1.9  $\mu M$  für die Tau Protein-Wechselwirkung bestimmt, wodurch die jeweilige Wechselwirkung stabilisiert zu sein scheint. Allerdings sind die messbaren Einflüsse von Ligand **45** auf die Bindung von C-RAF oder Tau Protein zu 14-3-3 $\zeta$  wenig ausgeprägt verglichen mit den Ergebnissen der entsprechenden FP-Experimente. Während bei den FP-Messungen ein 100-facher Überschuss des Liganden eingesetzt werden konnte, war hier nur ca. 3-facher Überschuss möglich. Trotzdem zeigt der Vergleich von  $K_D$  und  $K_{Dapp}$  die gleiche Tendenz; in Anwesenheit von **45** ist die Affinität der Peptidfragmente zu 14-3-3 $\zeta$  erhöht.



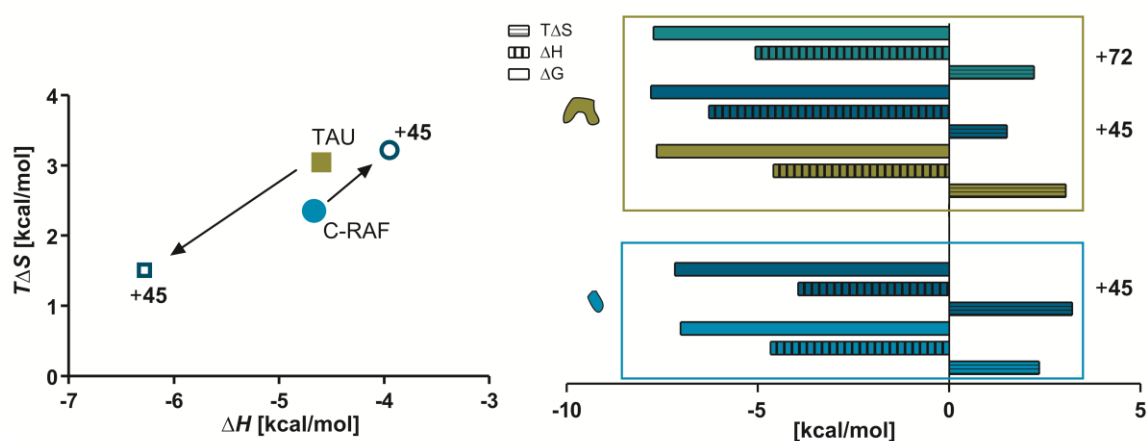
**Abbildung 61.** ITC Profile der Titrations von C-RAF und Tau Protein zu 14-3-3 $\zeta$  in An- und Abwesenheit von **45** bzw. **72**.

Der Einfluss des Arginin-Derivats (Ligand **72**) auf die 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung wurde ebenfalls untersucht. Hier konnte ein 5-facher Überschuss von **72** zu 14-3-3 $\zeta$  verwendet werden. Interessanterweise liegt der scheinbare  $K_D$ -Wert höher, d. h. die Messergebnisse weisen nicht auf einen stabilisierenden Effekt von **72** hin, sondern auf einen destabilisierenden. Aufgrund der thermodynamisch erfassten Daten lassen sich die Bindungsprozesse von C-RAF und Tau Protein an 14-3-3 $\zeta$  vergleichen. Beide werden dadurch charakterisiert, dass sie sowohl einen moderaten, günstigen enthalpischen als auch entropischen Beitrag aufweisen. Die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und anderen polaren Interaktionen zwischen den Peptidfragmenten und 14-3-3 $\zeta$  wird unterstützt von der gleichzeitigen Freisetzung von Wasser und Gegenionen. Die stöchiometrischen Faktoren zeigen an, dass zwei C-RAF-Fragmente bzw. ein Tau Protein-Fragment an ein 14-3-3 $\zeta$ -Dimer binden. Ein Überblick über die erhaltenen Daten ist in Tabelle 11 gegeben.

Tabelle 11. Ergebnisse der ITC-Messungen

	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_{Dapp}$ [ $\mu\text{M}$ ]	n	$\Delta H$ [kcalmol <sup>-1</sup> ]	$T\Delta S$ [kcalmol <sup>-1</sup> ] (T=298 K)	$\Delta G$ [kcalmol <sup>-1</sup> ]
<b>C-Raf zu</b>						
14-3-3 $\zeta$	7.3 $\pm$ 0.1		1.7 $\pm$ 0.1	-4.67 $\pm$ 0.11	2.34 $\pm$ 0.11	-7.02
14-3-3 $\zeta$ /45 (1:2.8)		5.5 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2	-3.95 $\pm$ 0.04	3.22 $\pm$ 0.09	-7.17
<b>TAU zu</b>						
14-3-3 $\zeta$	2.5 $\pm$ 0.3		1.1 $\pm$ 0.1	-4.60 $\pm$ 0.07	3.05 $\pm$ 0.14	-7.65
14-3-3 $\zeta$ /45 (1:2.8)		1.9	0.9	-6.28	1.51	-7.79
14-3-3 $\zeta$ /72 (1:5)		4.6	1.2	-5.07	2.22	-7.28

In Anwesenheit von **45** steigen sowohl der entropische als auch der enthalpische Beitrag der 14-3-3 $\zeta$ /C-RAF-Wechselwirkung an. Die Bindung von C-RAF scheint somit enthalpisch ungünstiger und Entropie-getriebener zu sein, wobei die Affinität dennoch gesteigert ist ( $\Delta\Delta G = -0.15 \text{ kJmol}^{-1}$ ). Genau gegenteilig, jedoch mit gleichen Resultat, verhalten sich Enthalpie und Entropie bei der 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung. Hier ist der enthalpische Beitrag um den Faktor 1.4 verringert und somit viel günstiger. Der entropische Beitrag ist gleichzeitig um die Hälfte reduziert, also deutlich ungünstiger. Dies deutet auf eine spezifischere Bindung von Tau Protein an 14-3-3 $\zeta$  in Gegenwart von **45** hin.

Abbildung 62. Übersicht der erhaltenen Enthalpie- und Entropie-Werte in An- und Abwesenheit der Liganden **45** und **72**.

Durch das Vormischen von 14-3-3 $\zeta$  und dem Liganden könnte schon ein gewisser Teil an Wasser und Gegenionen freigesetzt worden sein, der so nicht mehr Einfluss auf die Entropie der Tau/14-3-3 $\zeta$ -Bindung nehmen kann und energetisch den Verlust der konformativen Freiheitsgrade von Tau nicht mehr in selben Maße kompensieren kann. Tau Protein ist im Vergleich zu C-RAF viel größer

und bindet über zwei Bindungsstellen an 14-3-3ζ. Insgesamt ist die Bindungsaffinität von Tau an den Komplex aus **45** und 14-3-3ζ höher als an 14-3-3ζ alleine, wobei der Betrag der Gibbs-Energie um  $0.14 \text{ kJmol}^{-1}$  verringert ist, also eigentlich nicht signifikant.

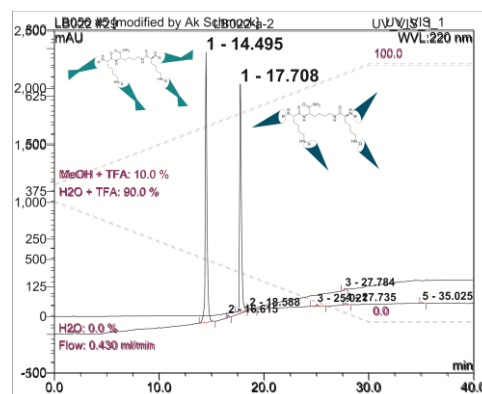
In Anwesenheit von **72** sind Enthalpie- und Entropie-Term ebenfalls vermindert,  $-0.47 \text{ kJmol}^{-1}$  bzw.  $-0.83 \text{ kJmol}^{-1}$ . Allerdings fallen die Veränderung der Beiträge jeweils ca.  $1 \text{ kJmol}^{-1}$  geringer aus. Die GCP-tragende Verbindung **45** ist hydrophober als das Argininderivat (s. Abbildung 63), was sicher auch den entropischen Beitrag beeinflusst. Durch die Überkompensation des enthalpischen Anteils durch die Entropieabnahme, steigt die Gibbs Energie um  $0.36 \text{ kJmol}^{-1}$  an, wodurch die Bindungsaffinität von Tau Protein zu 14-3-3ζ in Gegenwart von **72** geringer ausfällt. Auch hier ist kann das unterschiedliche Verhalten nur auf die Liganden und insbesondere auf

die GCP-Einheit zurückzuführen sein. Die Bindungsaffinität von Tau Protein zu 14-3-3ζ wird in Anwesenheit des GCP-tragenden Liganden durch eine günstigere, Enthalpie-getriebene Bindung gesteigert. Der Entropiebeitrag ist in Summe zwar immer noch günstig, jedoch deutet eine Minderung auf weniger konformative Freiheiten von Tau Protein hin, was letztlich zu einer spezifischeren Bindung und einer geringeren Gibbs-Energie führt.

Insgesamt sind die ITC-Experimente durch das Verhalten der Liganden limitiert und für aussagekräftige Schlussfolgerungen nur bedingt geeignet. Daher wurden zur Untersuchung der ternären Komplexe zusätzliche Methoden eingesetzt.

#### 4.2.2.5. DLS-Messungen

In der biologischen Forschung stellt die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch bekannt unter Photonenkorrelationsspektroskopie, eine gängige Methode zur Bestimmung der Größen von Partikeln, z. B. Proteinen, Nukleinsäuren oder deren Komplexe, dar.<sup>[523–525]</sup> Die Technik basiert darauf, dass die Partikel, die sich in der Probenlösung befinden, mit monochromatischem Licht bestrahlt werden, dieses Licht streuen und darüber die Bewegung der Teilchen gemessen werden kann. Die Teilchenbewegungen werden dann durch Korrelationsfunktionen analysiert. Die Intensitätsautokorrelationsfunktion beschreibt die Veränderung der Intensität des gestreuten Lichts, indem die Intensitäten bei einer Zeit  $t$  mit einer Intensität bei einem späteren Zeitpunkt  $t+\tau$  verglichen werden. Dadurch kann das Flackern des gestreuten Lichts gemessen werden. Desweiteren werden die Bewegungen der Partikel relativ zueinander verglichen, wobei angenommen wird, dass die Partikel der Brownschen Molekülbewegung unterliegen.<sup>[526–529]</sup> Die



**Abbildung 63.** Überlagerung der HPLC-Läufe von **72** (grün, linker Peak  $t_R = 14.5 \text{ Min}$ ) und **45** (blau, rechter Peak  $t_R = 17.7 \text{ Min}$ ), bei gleichen Laufbedingungen (Gradientenlauf von 10-100% MeOH + 0.05%TFA innerhalb von 30 min).

Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel bewegen, ist abhängig von der Temperatur, der Viskosität der Lösung und von der Größe der Partikel. Ein Partikel bewegt sich, bei hoher Temperatur, niedriger Viskosität oder bei kleiner Größe schneller. Die Geschwindigkeit der Partikel kann über den translationalen Diffusionskoeffizienten  $D_t$  ausgedrückt werden. Über die *Stokes-Einstein-Gleichung* (9) kann  $D_t$  direkt mit dem hydrodynamischen Radius  $r_H$  eines Partikels in Verbindung gebracht werden.

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (9)$$

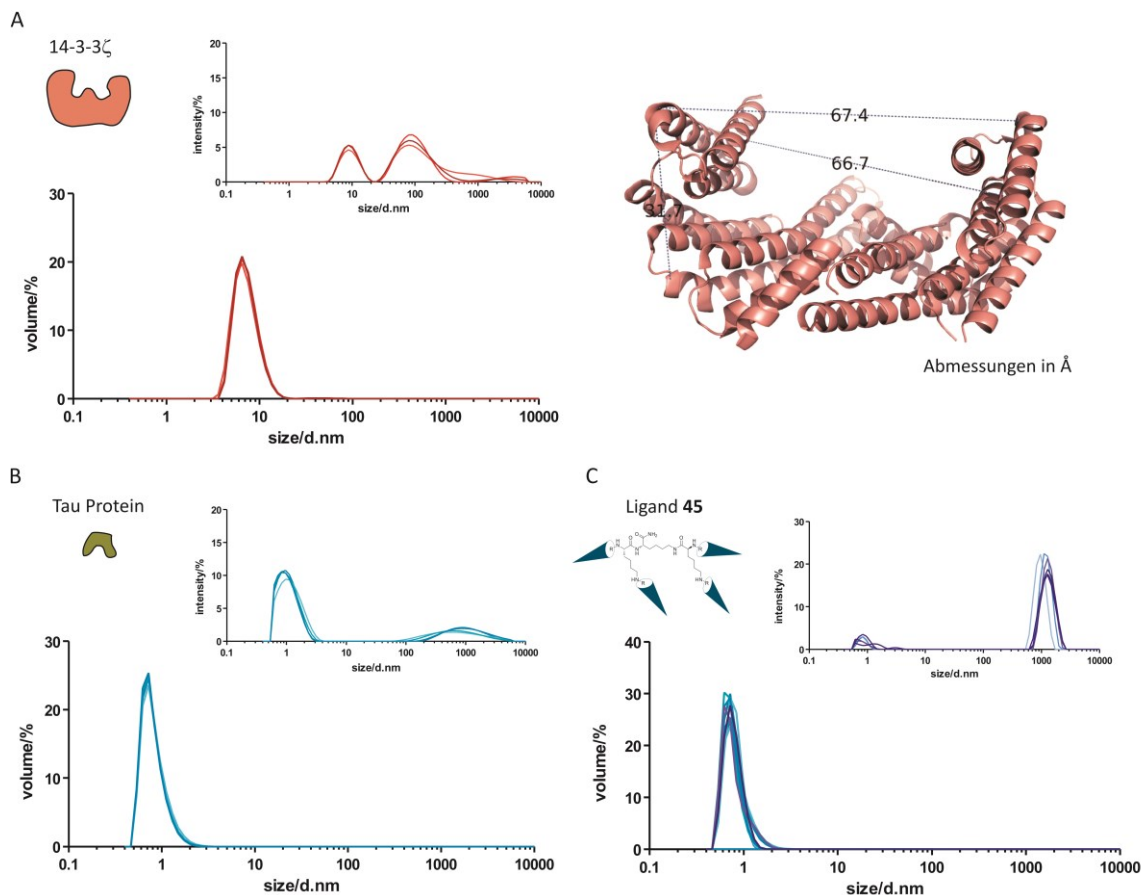
Über diesen Zusammenhang kann so letztlich die Größe der Teilchen ermittelt werden. Dabei wird angenommen, dass die Teilchen sphärisch sind und für Partikel, die kleiner als 1/20 der eingestrahlten Wellenlänge, die *Rayleigh*-Theorie für Lichtstreuung Anwendung findet, wobei gilt, dass die Streuung des Lichts isotrop erfolgt und sich die Intensität des Lichts proportional zur 6. Potenz des Durchmessers verhält. Bei größeren Partikeln, deren Durchmesser im Größenbereich der eingestrahlten Wellenlänge liegen, findet die *Mie*-Theorie Anwendung.<sup>[526]</sup> Bei der Messung selbst wird die Probe mit einem He-Ne-Laser mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 633$  nm bestrahlt und die Lichtstreuung bei einem Streuwinkel von  $173^\circ$  gemessen. Alle Substanz- und Gemischlösungen wurden in Hepes-Puffer pH 7.5 (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) vorbereitet. Die Messungen fanden bei  $25^\circ C$  statt.

Zunächst wurden 14-3-3 $\zeta$ , Tau Protein und Ligand **45** separat voneinander untersucht. Die einzelnen Messungen sind in Abbildung 64 dargestellt. 14-3-3 $\zeta$  wurde sowohl mit einer Konzentration von 20  $\mu M$  als auch 4  $\mu M$  gemessen, um herauszufinden in welchem Konzentrationsbereich die Messungen optimal durchgeführt werden können. Bei beiden Konzentrationen fanden sich Partikel mit Größen ca. 6 nm. Die Größe der gefundenen Partikel stimmt mit den Größen, die der Kristallstruktur (pdb-Datei 4IHL) entnommen wurden, überein. Das Dimer weist hier in der Diagonalen einen Durchmesser von ca. 5–7 nm auf. Sowohl für Tau Protein als auch Ligand **45** finden sich bei diesen Konzentrationen (4 und 20  $\mu M$ ) Partikel mit Größen  $\leq 1$  nm. Ligand **45** hat eine maximale Länge von ca. 5 nm und das Tau Protein eine von ca. 6 nm, sofern beide gestreckt vorliegen. Laut zugrundeliegender Theorie werden jedoch sphärische Partikel angenommen, somit würden die Längen der Proteine auch dem Durchmesser entsprechen. Aufgrund der hohen konformativen Flexibilität der peptidischen Liganden ist es allerdings schwer vorauszusagen, wie genau die Moleküle vorliegen. In wässriger Lösung ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass sich sowohl Tau Protein als auch der Ligand **45** knäueln und nicht ausgestreckt vorliegen, um die Phenylalaninreste und andere hydrophobe Reste vom Lösungsmittel fern zu halten. Daher sind kleinere Teilchengrößen viel wahrscheinlicher. Tau Protein und Ligand **45** können im DLS-Experiment nicht unterschieden werden.

Bei Betrachtung der Intensitäten-Größenverteilung der Tau Protein- und **45**-Proben ist klar ersichtlich, dass keinerlei Partikel im Größenbereich von 5–12 nm vorliegen, also in dem Bereich, in dem 14-3-3 $\zeta$  selbst oder mit 14-3-3 $\zeta$ -assoziierte Komplexe vorliegen könnten. Entsprechend finden



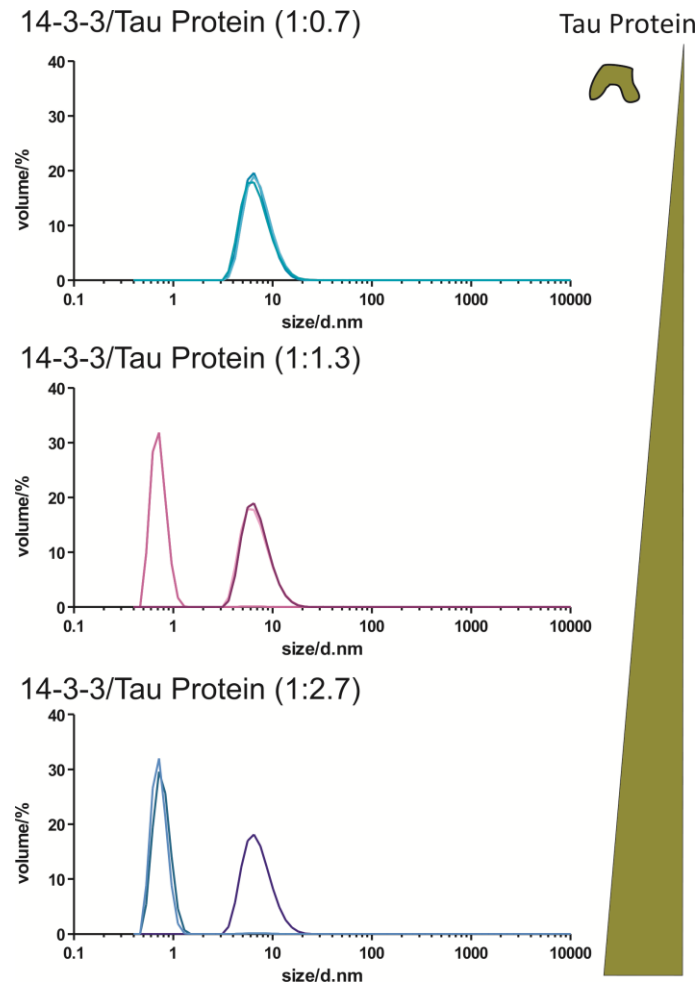
sich bei der Messung von 14-3-3ζ keine Partikel mit Größen  $<5$  nm, also in dem Bereich, in dem man die jeweiligen Bindungspartner erwarten würde.



**Abbildung 64.** DLS-Messung von 14-3-3ζ, Tau Protein und Ligand 45.

Es wurde weiterhin untersucht, wie sich 14-3-3ζ und Tau Protein bei verschiedenen relevanten Verhältnissen im Experiment präsentieren. Ähnlich konnten *Heilshorn et al.* in DLS-Untersuchungen die Größen verschiedener Aggregate des selbstassemblierenden Proteins Clathrin gleichzeitig in einem Experiment messen.<sup>[530]</sup> Die Konzentration von 14-3-3ζ wurde konstant bei 6 μM gehalten und verschiedene Konzentrationen von Tau Protein dazugegeben, anfänglich in einem leichten Unterschuss, so dass 14-3-3ζ und Tau Protein in einem Verhältnis von 1 : 0.7 vorlagen. Zu finden sind nur Partikel, die 14-3-3ζ bzw. einem Komplex aus 14-3-3ζ und Tau Protein zuzuordnen sind. Keine Teilchengrößen, die dem Tau Protein alleine zuzuordnen wären, waren zu beobachten. Eine Erklärung hierfür ist, dass Tau Protein komplett an 14-3-3ζ gebunden ist und somit nicht mehr frei vorliegt.

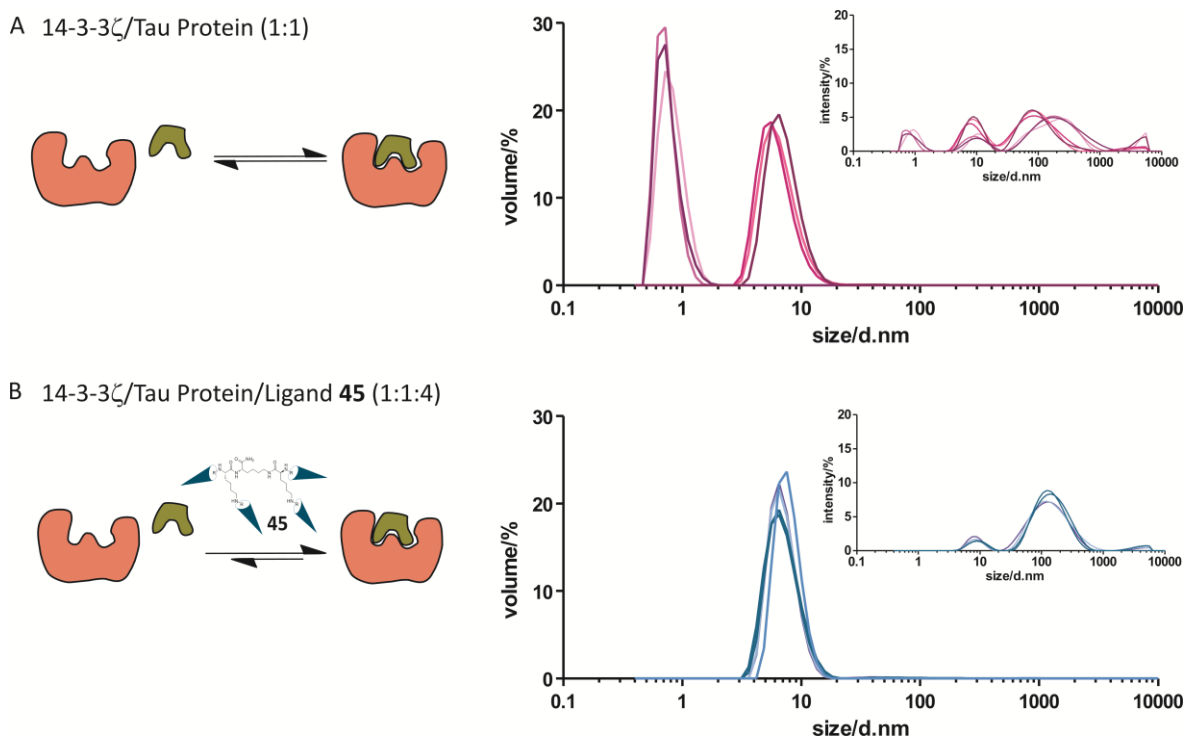




**Abbildung 65.** DLS-Messung von 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein in verschiedenen relevanten Verhältnissen. Oben: Tau Protein im Überschuss. Mitte und unten: leichter Tau Protein Überschuss.

Die Größenveränderung, die mit der Komplexbildung von 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein einhergeht, könnte zu gering sein, um in der Messung angezeigt zu werden. Bei einem leichten Überschuss dagegen liegen Partikel beider Größen vor, die also Tau Protein und 14-3-3 $\zeta$  zuzuordnen sind. Die Bindung von Tau Protein an 14-3-3 $\zeta$  ist ein dynamisches Gleichgewicht. Der  $K_D$ -Wert liegt bei ca. 5  $\mu$ M. Durch Zugabe von Ligand **45**, so zeigte sich aus den FP-Experimenten, wird die Wechselwirkung stabilisiert, d. h. das Gleichgewicht wird auf Seite des Komplexes verschoben. Die veränderten Größen, die sich aus der Komplexbildung zwischen Ligand **45** und 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein ergeben, sollen mit dieser Methode untersucht werden. Es wurde erwartet, dass die Komplexbildung auch durch Größenbestimmung mittels DLS nachweisbar ist. Dazu wurde zunächst eine 1 : 1-Mischung aus 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein ( $c = 4 \mu$ M) vermessen. Die Konzentration von 4  $\mu$ M wurde gewählt, da diese genau im Bereich des Gleichgewichts liegt, bei dem sowohl Komplex als auch dissoziierte Proteine vorliegen. Und genau das findet sich auch in der Messung. Es wurden gleichzeitig Partikelgrößen  $<1$  nm und 5–7 nm gefunden (Abbildung 66A). Die Partikel des Komplexes sind jedoch nicht von denen des reinen 14-3-3 $\zeta$  zu unterscheiden. Dennoch wurde Ligand **45** in 4-fachem Überschuss zu der Probe hinzugefügt, um zu testen, ob der Komplex stabilisiert wird.

Dieses vergleichsweise niedrige Verhältnis wurde gewählt, da bei höherem Überschuss von Ligand **45** ein Niederschlag ausgeflockt war. (Bei den FP-Experimenten konnte ein 100-facher Überschuss von **45** eingesetzt werden, allerdings bei viel niedrigeren Konzentrationen.) In der Tat fanden sich nur noch größere Partikel um 6–7 nm (Abbildung 66B), in der gleichen Größenordnung von 14-3-3 $\zeta$  alleine, und der Peak um 1 nm verschwindet vollständig. Dies könnte darauf hindeuten, dass tatsächlich keine dissoziierten Proteine mehr vorliegen, sondern sich alle im Komplex befinden, das Gleichgewicht also verschoben wurde.



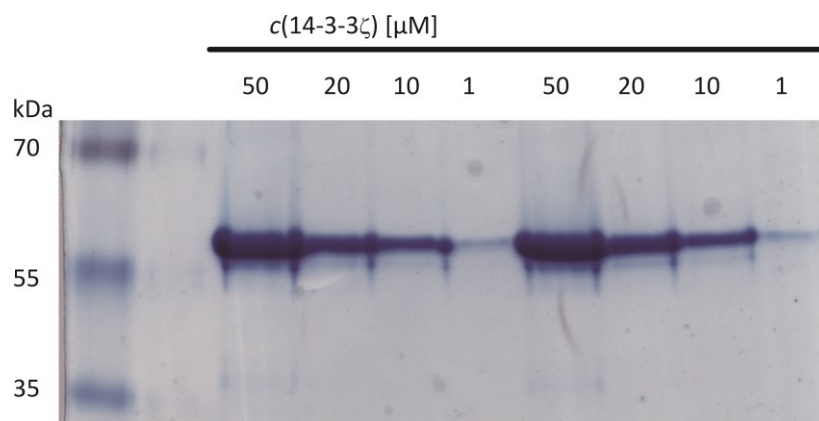
**Abbildung 66.** DLS-Untersuchung der Bindung von Ligand **45** an den Komplex aus 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein.

Insgesamt konnte mittels DLS die Interaktion von 14-3-3 $\zeta$  mit Tau Protein verfolgt werden. Beide Interaktionspartner konnten in einem Experiment nebeneinander vorliegend nachgewiesen werden. Der Komplex aus beiden konnte dagegen nicht eindeutig nachgewiesen werden, da die gefundenen Partikelgrößen auch 14-3-3 $\zeta$  alleine zuzuordnen sind. Weitere Experimente in Anwesenheit von Ligand **45**, für den schon in FP-Untersuchungen ein stabilisierender Effekt für die 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung nachgewiesen wurde, deuten darauf hin, dass auch hier dieser Effekt beobachtet werden kann. Allein betrachtet ist die DLS-Methode jedoch nicht aussagekräftig genug, die Stabilisierung der hier untersuchten 14-3-3 $\zeta$ -PPI zu erforschen, da keine neue Bande entsteht/verschwindet, die eindeutig dem Komplex aus allen drei Verbindungen zuzuordnen ist.

#### 4.2.2.6. Gel-Elektrophorese

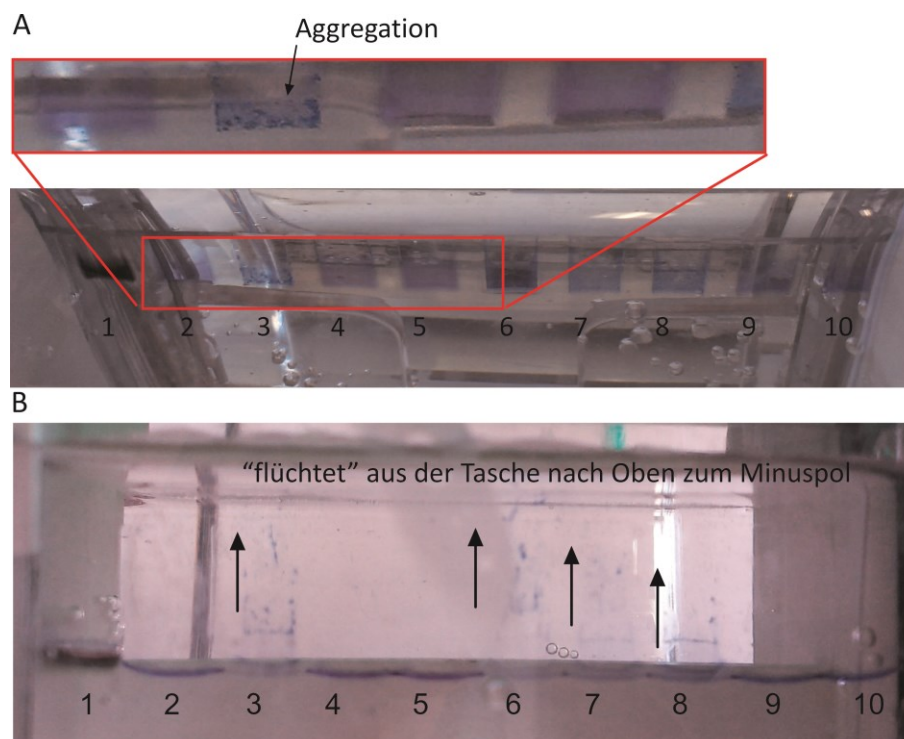
PAGE (Polyacrylamid Gel-Elektrophorese) ist in der Biologie eine gebräuchliche Methode DNS-Fragmente oder Proteine aufzutrennen. In nicht-dissoziativen Systemen, wie nativen PAGE, werden Proteine anders als bei SDS-PAGE nicht (nur) nach ihrer Größe aufgetrennt, sondern auch nach Ladung und Form. Meistens ist somit die genaue Bestimmung des Molekulargewichts nicht möglich. Native Gele werden daher eher dann verwendet, wenn das Protein intakt bleiben soll und so z. B. dessen enzymatische Aktivität, Oligomerisierungszustand oder Bindungseigenschaften untersucht werden sollen.<sup>[531]</sup> Für die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen ist daher die Verwendung nicht-dissoziativer Elektrophoresen sinnvoll. Die Experimente wurden mit Hilfe von Dr. Christine Beuck aus der Arbeitsgruppe Beyer durchgeführt. Zunächst wurde 14-3-3ζ alleine untersucht, um eine für die folgenden Experimente geeignete Konzentration von 14-3-3ζ zu finden, bei der die 14-3-3ζ-Bande deutlich sichtbar ist. Wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben, bilden 14-3-3ζ-Proteine Dimere, wobei ein Monomer 25-30 kDa aufweist. Da hier die nicht-dissoziative Methode verwendet wird, ist zu erwarten, dass 14-3-3ζ als Dimer vorliegt und Banden um ca. 60 kDa gefunden werden. Dies ist im Vorfeld zu ermitteln. Von 14-3-3ζ wurden also vier Lösungen unterschiedlicher Konzentration ( $c_{\text{final}} = 50, 20, 10$  und  $1 \mu\text{M}$ ) in Hepes-Puffer pH 7.5 (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) angefertigt. Die Proben wurden im Verhältnis von 1 : 5 mit einer gesättigten Lösung aus Bromphenolblau in Wasser, die 30 % Glycerin enthielt, versetzt und diese Mischung dann in die Taschen des Gels (12.5 % Acrylamid) eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 175 V über 1.45 Stunden. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau® angefärbt. Coomassie Blau ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der mit den hydrophoben und basischen Seitenketten von Aminosäuren interagieren kann. Dadurch bildet es nicht-kovalente Komplexe mit Proteinen, die sich im sauren Milieu blau färben.<sup>[532,533]</sup> Der Farbstoff ist somit sowohl dafür geeignet 14-3-3ζ und die Partnerpeptide anzufärben als auch die polykationischen, peptidischen Liganden. Als Referenz wurde kommerziell erhältlicher Proteinmarker *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* verwendet.

Auf dem Gel in Abbildung 67 sind unterschiedlich intensive Banden zu sehen, die sich alle in einem Bereich von ca. 60 kDa, also knapp über der Standardbande von 55 kDa, befinden. Das Ergebnis zeigt, dass 14-3-3ζ unter den gewählten Bedingungen nicht nur hervorragend läuft, sondern auch als Dimer vorzuliegen scheint. Die intensivste Bande entspricht einer 14-3-3ζ Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Dagegen ist die Bande der 1  $\mu\text{M}$  14-3-3ζ Lösung kaum zu erkennen. Die Bande der 10  $\mu\text{M}$  14-3-3ζ-Lösung ist klar und deutlich abgegrenzt (distinkt), so dass diese Konzentration für die weiteren Experimente ausgewählt wurde.



**Abbildung 67.** Native PAGE von verschieden konzentrierten 14-3-3 $\zeta$ -Proben. Die Banden der 1, 10, 20 und 50  $\mu$ M Lösungen sind je doppelt zu sehen. Die Banden liegen alle bei ca. 60 kDa, was darauf hindeutet, dass 14-3-3 $\zeta$  als Dimer vorliegt.

Danach wurde untersucht, ob die Komplexbildung von 14-3-3 $\zeta$  mit den jeweiligen Partnerproteinen in An- und Abwesenheit von Ligand **45** zu verfolgen ist. Dafür wurden als Kontrollen die Partnerproteine C-RAF und Tau Protein mit Konzentrationen von 20  $\mu$ M bzw 10  $\mu$ M mittels PAGE untersucht, sowie der Ligand **45** bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M. Von Ligand **45** wurde analog zu den FP-Experimenten - bei denen 14-3-3 $\zeta$  und Ligand **45** in einem Verhältnis von 1 : 100 vorlagen - ebenfalls ein Überschuss verwendet. Desweiteren wurden binäre Gemische von 14-3-3 $\zeta$  mit C-RAF (1 : 2, wobei sich die 1 auf das 14-3-3 $\zeta$ -Dimer bezieht), Tau Protein (1 : 1) und Ligand **45** (1 : 50) untersucht. Zudem wurden ternäre Gemische, bestehend aus 14-3-3 $\zeta$ /C-RAF/Ligand **45** (1 : 2 : 50) und 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein/Ligand **45** (1:1:50), angefertigt.

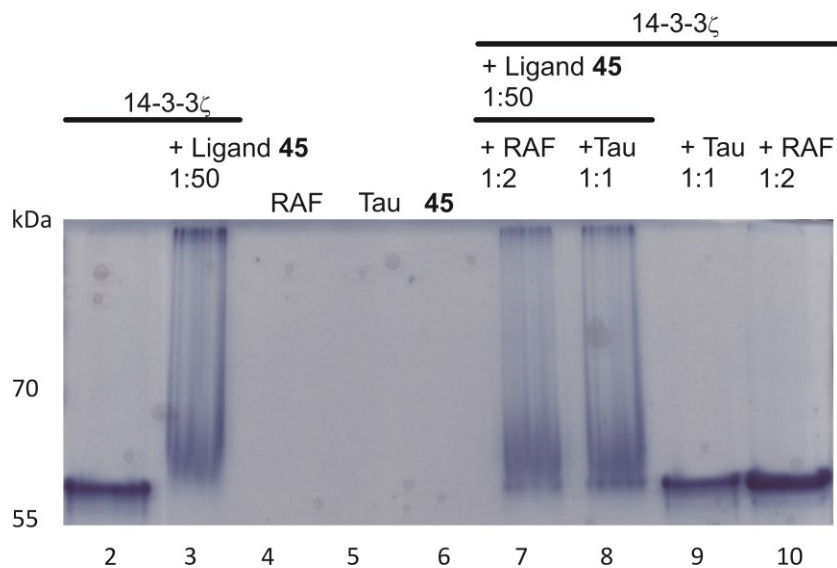


**Abbildung 68.** Während des Laufs: A) direkt nach Start sind schon Aggregate in Kammer 3 zu sehen. B) nach wenigen Minuten steigen die Proben(teile) aus den Kammern 3, 6, 7 und 8 auf.

Direkt nach Anlegen der Spannung von 175 V, zeigte sich, dass sich in den Taschen 3, 6, 7 und 8 Aggregate gebildet hatten (Abbildung 68, oben), die bei dem Befüllen der Taschen mit der tiefblauen Lösung nicht zu sehen waren. In diesen Taschen findet sich immer ein Gemisch aus **45** mit 14-3-3 $\zeta$  (3) und zusätzlich C-RAF (7) bzw. Tau Protein (8). Außerdem scheinen die Proben aus den Taschen nach oben zum Minuspol zu wandern (Abbildung 68, unten) und nicht vollständig ins Gel einzusinken. Die einzige Probe (Kammer 6), die überhaupt nicht in das Gel einzusinken scheint, ist die des isolierten Liganden **45**.

Das Verhalten von Ligand **45** ist damit zu erklären, dass die polykationische Verbindung bei Anlegen der Spannung entsprechend ihrer Ladung zum oben befindlichen Minuspol der Apparatur wandert. Bei den Gemischen ist der Sachverhalt nicht so eindeutig. Hier könnte es sich um den Überschuss von Ligand **45** handeln, der aufwärts wandert, oder auch um Aggregate mit 14-3-3 $\zeta$ , die sich vorab gebildet haben. Falls Ligand **45** an 14-3-3 $\zeta$  bindet, könnte ein Teil der Ladung durch die elektrostatischen Interaktionen kompensiert werden, wodurch sich das Laufverhalten der Proben im Vergleich zu isoliertem 14-3-3 $\zeta$  ebenfalls ändern könnte. Allerdings müssten diese Komplexe insgesamt positiv geladen sein, um zum Minuspol zu wandern. Um was es sich bei den aufwärts wandernden Partikeln im einzelnen handelt, ist also rein spekulativ. Die gewählten Konzentrationsverhältnisse scheinen also für das Experiment unglücklich gewählt worden zu sein. Es wurde deshalb versucht diese im Folgenden zu optimieren. Die Elektrophorese wurde nach 1:45 h beendet und das Gel anschließend mit Coomassie Blau angefärbt. Das Gel zeigt für 14-3-3 $\zeta$  (Kammer 2) wieder eine distinkte Bande bei ca. 60 kDa. Die Gemische aus 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF (Kammer 10) und Tau Protein (Kammer 9) zeigen vergleichbare Banden. Hier ist also nicht zu unterscheiden, ob 14-3-3 $\zeta$  isoliert vorliegt oder als Komplex. Lediglich die Intensität der Bande 10 ist erhöht. Die Kontrollläufe von C-RAF (Kammer 4) und Tau Protein (Kammer 5) zeigen jeweils keine Bande an, was dazu passt, dass beide Peptidfragmente mit 1.3 bzw. 2.8 kDa schnell durch das Gel bzw. aus dem Gel herauswandern, so dass keine sichtbare Bande auftreten kann. Die Proteinleiter zeigt nur noch Proteine >25 kDa an, alle kleineren Peptide oder Proteine, sollten sich nicht mehr auf dem Gel befinden. Für Ligand **45** (Tasche 6) war schon während des Laufs ersichtlich, dass die Probe nicht in das Gel einzusinken schien, sondern vielmehr die Tasche in Richtung Minuspol verlassen hatte. Eine Abbildung des gesamten Gels ist in Abbildung 69 dargestellt. Interessanterweise sind im Gel auch drei vollständig verschmierte Bereiche zu sehen. In Kammer 3 befand sich ein Gemisch aus 14-3-3 $\zeta$  und Ligand **45**. Hier zeigen sich zunächst bis zu der Höhe von ca. 60 kDa blaue, ungleichmäßig verteilte Schlieren. Direkt am Anfang des Trenngels erkennt man eine schwache dünne, unterbrochene blaue Linie, gefolgt von einer intensiveren Färbung im Bereich von 60–65 kDa. Ähnlich verhält es sich mit den Proben der ternären Gemische, wobei die Linie am Trenngelanfang nicht so ausgeprägt ist und auch insgesamt die Färbung weniger intensiv erscheint. Offensichtlich ist nur ein Teil der Probe in das Gel gelangt. Die Schlieren könnten auf mehrere Dinge hindeuten. Zum einen könnte die Probe ungleichmäßig und zu verschiedenen Zeiten in das Gel gelangt sein, da

diese vorher aggregiert waren. Falls sich zwischen 14-3-3ζ und Ligand **45** bzw. zusätzlich den Partnerproteinen Komplexe bildeten, handelt es sich um transiente Gleichgewichte.



**Abbildung 69.** Native PAGE. Kontrollen und erste Läufe binärer und ternärer Mischungen; die verschmierten Bereiche liegen nur in Anwesenheit von **45** vor.

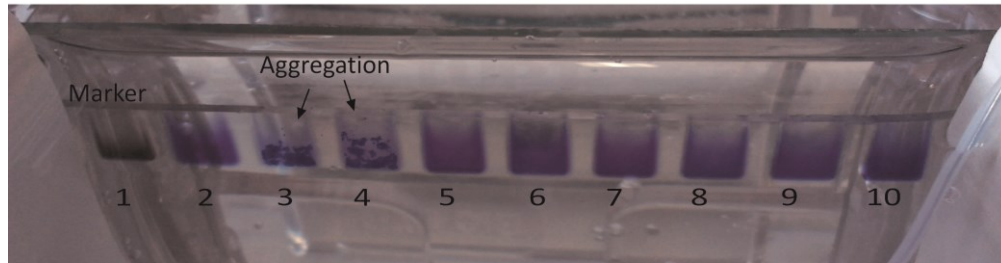
Die Komplexe von 14-3-3ζ mit den Partnerproteinen sind im unteren mikromolaren Bereich und somit auch nicht besonders stark. Während des Laufs können die Komplexe also somit zerfallen und in dem Fall würden die einzelnen Verbindungen mitunter in unterschiedliche Richtungen entsprechend ihrer jeweiligen Ladungen auf dem Gel wandern. Die Komplexe können zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Elektrophorese dissoziieren, wodurch ebenfalls die verschmierte Phase hervorgerufen werden könnte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass sich bei der Komplexierung auch die Oberflächenladung des Moleküls verändern kann, da die Interaktion von den Liganden an 14-3-3 auch elektrostatischer Natur sind. Die negative Oberflächenladung von 14-3-3ζ könnte also (teil)kompensiert werden, wodurch sich die Laufeigenschaften des Komplexes verändern könnten.

Der nächste PAGE-Lauf wurde optimiert. Anstelle von 1:45 h wurde die Laufzeit auf 1 Stunde reduziert. So sollten die Verbindungen eine kürzere Zeitspanne der angelegten Spannung ausgesetzt sein, was sich positiv auf die Komplexstabilität auswirken könnte. Zudem wurde dem Trenngel (12.5 % Acrylamid) 5 % Glycerin zur Proteinstabilisierung beigelegt. Weil die Läufe von Tau Protein und C-RAF keine Unterschiede aufwiesen, wurde auf weitere Untersuchungen von C-RAF verzichtet und nur noch das größere Tau Protein für die Experimente verwendet. Da höhere Konzentrationen von **45** mit 14-3-3ζ zu Aggregation führten, wurden 1 : 20-, 1 : 10- und 1 : 5-Verhältnisse von 14-3-3ζ und **45** gewählt und diese in An- und Abwesenheit von Tau Protein untersucht und zum direkten Vergleich nebeneinander laufen gelassen. Bei Anlegen der Spannung

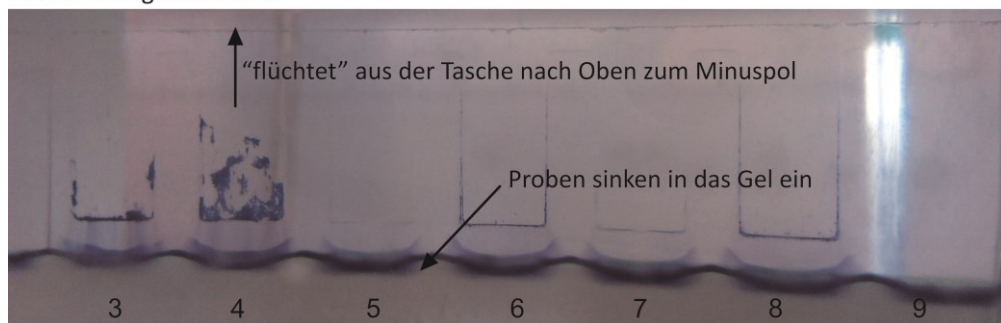


von 175 V zeigte sich, dass ein Verhältnis von 1 : 20 (14-3-3 $\zeta$ /45) immer noch zu hoch gewählt war, da sich wieder Aggregate bildeten, die aus der Tasche zum Minuspol wandern (Abbildung 70).

A Start der Elektrophorese

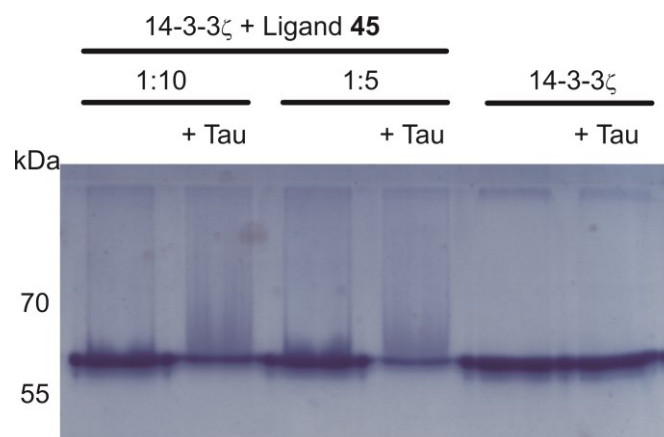


B Nach wenigen Minuten



**Abbildung 70.** Direkt nach Anlegen der Spannung ist wieder ein Aggregationsverhalten zu sehen. In Kammern 3 und 4 ist die höchste Konzentration von 45.

Versuche den Ladungsüberschuss mittels  $\zeta$ -Potentialmessungen der Ligand/Protein-Komplexe zu bestimmen schlugen fehl, da sich nach der Messung ein schwarzer Niederschlag auf den Elektroden abgesetzt hatte, der nicht wieder aufzulösen war. Alle anderen Proben scheinen in das Gel einzutreten. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel wiederum mit Coomassie Blau angefärbt. Wieder ist die distinkte Bande von 14-3-3 $\zeta$  zu erkennen (Abbildung 71).



**Abbildung 71.** Native PAGE. Für 14-3-3 $\zeta$ , den Mischungen aus 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein und 14-3-3 $\zeta$ /Ligand 4 sind jeweils distinkte Banden zu sehen. Erst bei den ternären Gemischen scheinen die Banden weniger intensiv zu sein, was auf eine Wechselwirkung aller drei Komponenten hindeuten könnte.

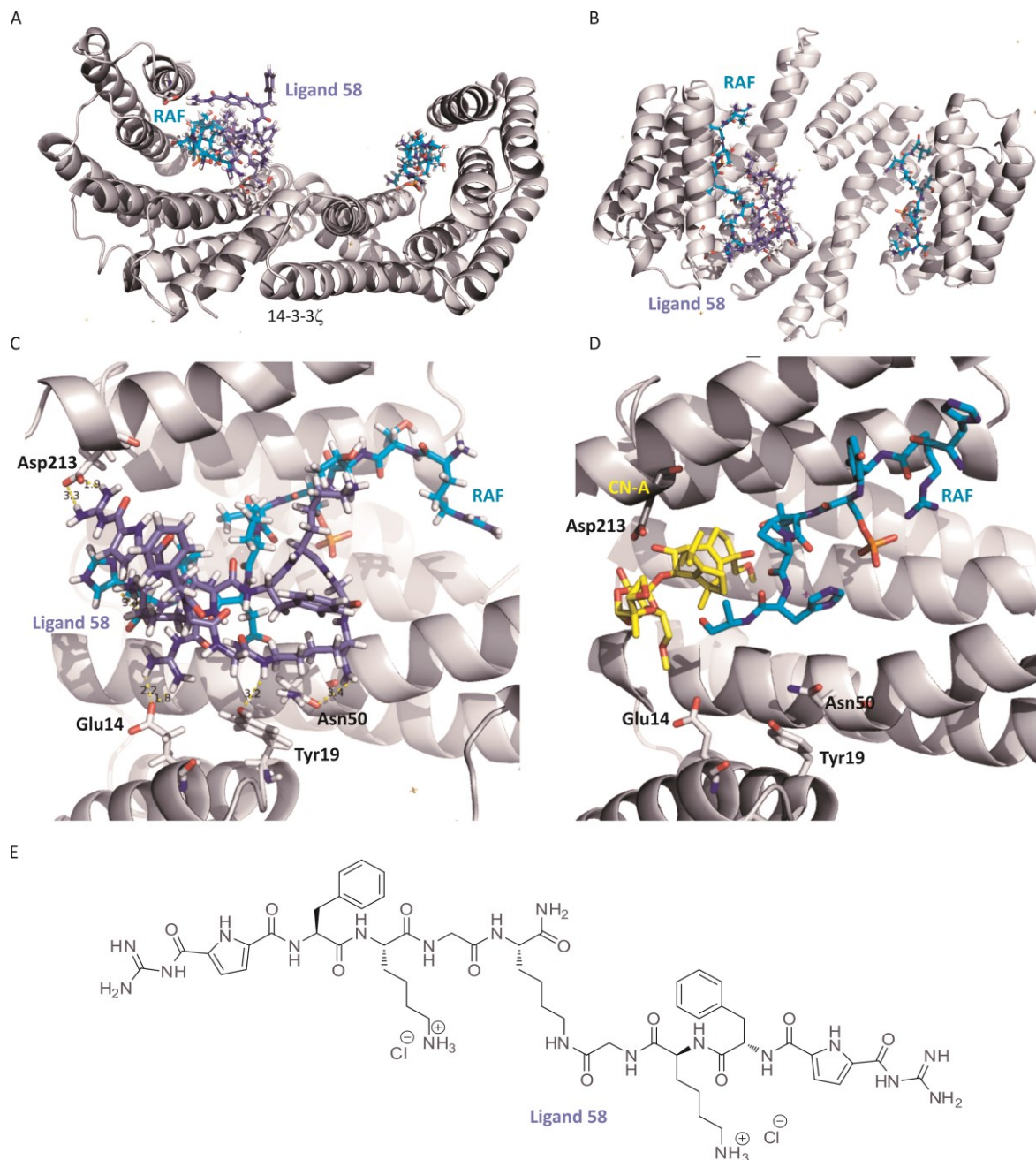
Die Bande der 1 : 1-Lösung aus 14-3-3ζ und Tau Protein sieht allerdings identisch aus und somit ist nicht festzustellen, ob es bei der Bande um den Komplex oder 14-3-3ζ alleine handelt. Festzustellen ist auch, dass nur eine Bande vorliegt, es gibt keine Andeutung einer zweiten Bande oder eines verschmierten Bereichs. Bei den Proben aus 14-3-3ζ/Ligand **45**-Gemischen zeigen sich ebenfalls intensive Banden, die im Vergleich zu 14-3-3ζ ausgefranst und weniger distinkt erscheinen. Bei Anwesenheit von Tau Protein scheint die Intensität der Bande deutlich reduziert zu sein und oberhalb der Bande ist wieder eine leichte Verschmierung der Bande zu erkennen. Das veränderte Verhalten der Proben scheint auf die Anwesenheit von Tau Protein zurückzuführen zu sein. Durch Vergleich mit den Proben ohne Tau Protein und den Kontrollen zeigte sich in der Tat, dass tatsächlich alle drei Komponenten – 14-3-3ζ, Ligand **45** und Tau Protein – miteinander interagieren. Die unterschiedlichen Mobilitäten sind auf eine veränderte Ladung und veränderte Form zurückzuführen.

Diese ersten Ergebnisse der Untersuchung der 14-3-3ζ-PPI mittels nativer PAGE deuten auf eine Wechselwirkung des 14-3-3ζ/Tau Protein-Komplexes mit dem multivalenten Liganden **45** hin, der – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus FP-, ITC- und DLS-Messungen – den Komplex wahrscheinlich stabilisiert. Allerdings bleibt die Frage offen, wo genau die Bindung stattfinden könnte.

#### 4.2.2.7. Erste Hinweise auf den Bindungsort

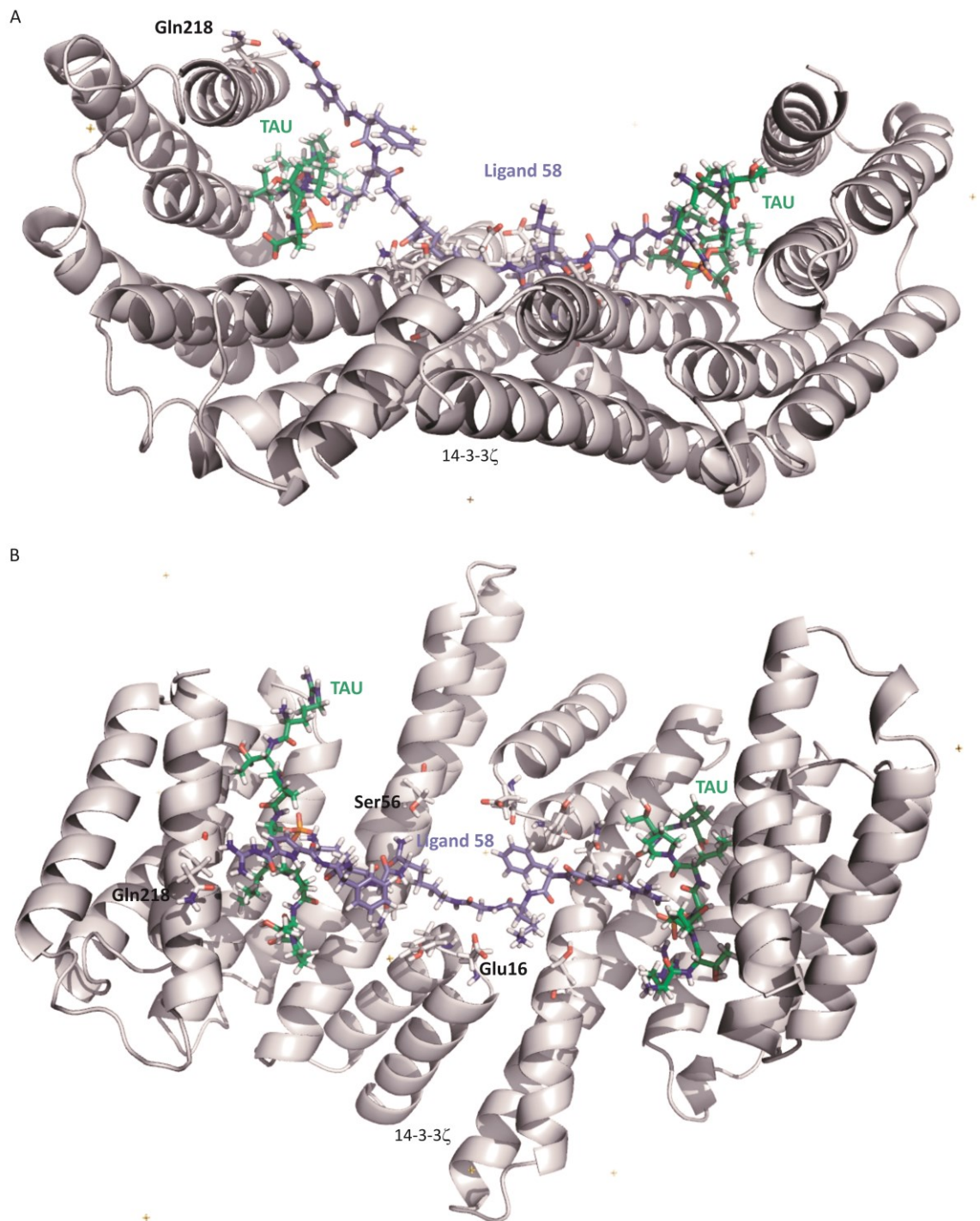
Kristallisationsversuche der ternären Komplexe aus 14-3-3ζ/C-RAF und einem multivalenten Liganden blieben bisher erfolglos; wahrscheinlich aufgrund der hohen Flexibilität der Liganden. Erste Hinweise auf den Bindungsort liefern jedoch Kraftfeld-Rechnungen, die von *Javier Iglesias* und *Niklas Tötsch* aus der Gruppe von *Elsa Sánchez-García* am MPI Mülheim durchgeführt wurden. Die Simulationen (*Amber FF99SB* Kraftfeld für Aminosäuren, *general Amber* Kraftfeld für GCP, *TIP3P* Wassermode) wurden für die Wechselwirkungen zwischen 14-3-3ζ, Ligand **58** und den Peptidfragmenten von C-RAF bzw. Tau Protein durchgeführt (genauer mit den Fragmenten RTP-pS214-LPT von Tau Protein und RST-pS259-TPNVH von C-RAF). Die ersten Rechnungen deuten darauf hin, dass Ligand **58** ähnlich Cotylenin-A (**CN-A**) am äußeren Rand der Bindungsfurche von 14-3-3ζ binden kann, ist C-RAF zugegen (s. Abbildung 72). Interaktionen des Liganden erfolgt dabei an Glu14 und Asp213 von 14-3-3ζ. Gleichzeitig kann **58** auch mit der Phosphatgruppe und dem freien C-Terminus von C-RAF wechselwirken. Die Rechnungen unterstützen somit die Annahme einer ternären Komplexbildung zwischen 14-3-3ζ/C-RAF und Ligand **58**.





**Abbildung 72.** A) Simulation von **58**, C-RAF und 14-3-3ζ. B) Kristallstruktur (pdb 4IHL) von CN-A und C-RAF an 14-3-3ζ; hervorgehoben sind Glu14, Tyr19, Asn50 und Asp213 von 14-3-3ζ.

Erste Simulationen des Liganden **58** mit 14-3-3ζ in Anwesenheit von Tau Protein zeigen eine weitere Interaktionsvariante des Liganden. In Abbildung 73 ist zu sehen wie sich der Ligand in der Innenseite von 14-3-3ζ an die W-Form des Proteins über die durch 14-3-3ζ gebildete Pore anschmiegt. Dabei könnten die Aminosäuren Gln218, Ser56, Glu16 des 14-3-3ζ-Dimers sowie die Phosphatgruppen der Tau Proteinf Fragmente mit Ligand **58** wechselwirken. Auch diese Simulation deutet somit auf eine ternäre Komplexbildung hin.



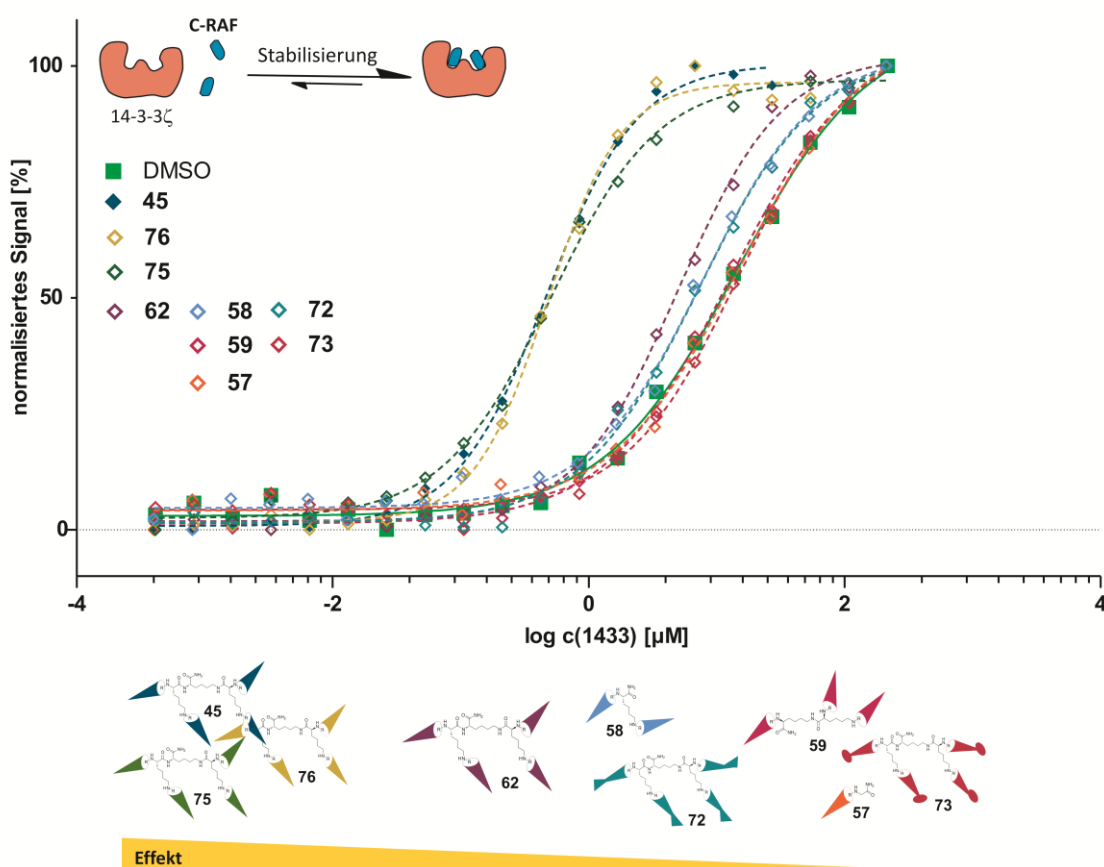
**Abbildung 73.** A) Seitenansicht des simulierten Komplexes aus 14-3-3ζ (grau), Tau Proteinfragmenten (grün) und Ligand 58 (blau). B) Ansicht von oben. Die Tau Proteinfragmente (RTP-pS214-LPT) befinden sich jeweils in den Bindungsfurchen von 14-3-3ζ. Ligand 58 liegt gestreckt innerhalb des 14-3-3ζ-Dimers und kann dabei sowohl mit den Aminosäureresten Gln218, Ser56 und Glu16 von 14-3-3ζ als auch den Phosphatgruppen der jeweiligen Tau Proteinfragmente wechselwirken.

Diese ersten Simulationen deuten auf zwei unterschiedliche Interaktionsvarianten für den zweiarmigen Liganden 58 mit 14-3-3ζ/C-RAF und 14-3-3ζ/Tau Protein hin, wobei 58 entweder mit einem 14-3-3ζ Monomer oder gestreckt vorliegend mit dem 14-3-3ζ-Dimer, sowie den jeweiligen Interaktionspartner wechselwirkt.

#### 4.2.3. Zusammenfassung PPI-Stabilisierung durch multivalente Liganden

Es konnte in der vorliegenden Dissertation eine neue Klasse von Liganden hergestellt werden, die zum ersten Mal durch Kombination von Multivalenz und einem maßgeschneiderten Oxo-Anionenbindungsmotiv PPI stabilisieren. Als Leitstruktur stabilisiert die vierarmige Verbindung **45** mit der Seitenarmsequenz GKF-GCP sowohl die 14-3-3 $\zeta$ -Wechselwirkung mit C-RAF als auch mit Tau Protein. Ein Überblick findet sich in Abbildung 74. Die Untersuchung dieser Gleichgewichtsverschiebung erfolgte mit mehreren Methoden wie FP, ITC, DLS oder native PAGE, deren experimentelle Vorgehensweisen eigens an die verwendeten Systeme angepasst wurden. FP bleibt dennoch die einfachste und effizienteste Methode, Modulationen von PPI zu verfolgen, da sowohl der Einfluss von Liganden auf die direkte Bindung zwischen zwei Proteinen als auch die Bindung des Liganden an den Proteinkomplex erfasst werden können. Hierbei zeigte sich eindrucksvoll durch Messung in An- und Abwesenheit der Liganden, dass multivalente Liganden die Bindungskonstante zwischen 14-3-3 $\zeta$  und dem jeweiligen Partnerpeptid gegenüber den niedervalenten Liganden signifikant (im Fall von **45** um den Faktor 15) herabsenken können, der Komplex also stabilisiert wird. Gleichzeitig konnten höhere Bindungsaffinitäten an den Komplex aus 14-3-3 $\zeta$  und Partnerpeptid beobachtet werden. Neben der vierarmigen Verbindung weist nur noch der zweiarmige Ligand **58** einen stabilisierenden Effekt der 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung auf; die ein- und drei-armigen Verbindungen zeigten keinen merkbaren Effekt. Die Untersuchung der direkten Bindung von **45** an 14-3-3 $\zeta$  mittels SPR lieferte eine Bindungskonstante, die nahezu eine Größenordnung über der mittels FP bestimmten Bindung von **45** an den Komplex von 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein liegt. Die Bindungsaffinität von Tau Protein zu 14-3-3 $\zeta$  wird in Anwesenheit des GCP-tragenden Liganden durch eine günstigere, Enthalpie-getriebene Bindung gesteigert. Dies und die gleichzeitige leichte Senkung des Entropiebeitrags in Anwesenheit von **45** deuten auf eine spezifischere, durch **45** vermittelte Bindung von Tau Protein an 14-3-3 $\zeta$  hin. Der stabilisierende Effekt von **45** kann zudem maßgeblich auf die GCP-Einheit zurückgeführt werden, da in Vergleichsstudien mit Arginin- und Lysin-tragenden analogen Derivaten diese, wenn denn überhaupt, dann einen deutlich verminderten Effekt ausübten. Durch Bestimmung der  $pK_s$ -Werte der Liganden konnten die Protonierungsgrade der einzelnen funktionellen Gruppen ermittelt werden, wobei GCP tatsächlich hauptsächlich über die Ausbildung des wohlorganisierten Wasserstoffbrückennetzwerkes und weniger durch dessen Kombination mit Ionischen Wechselwirkung an die Proteinoberfläche zu binden vermag. Kraftfeldrechnungen gaben erste Hinweise auf den äußeren Rand der Bindungsfurche von 14-3-3 $\zeta$  als möglichen Bindungsort der Liganden. Die Simulationen wurden mit dem zweiarmigen Liganden durchgeführt, der gleichzeitig mit der Phosphatgruppe von C-RAF und Asparagin- oder Glutaminsäuren von 14-3-3 $\zeta$  interagieren könnte. Kristallisationsversuche blieben bislang erfolglos. Allerdings wurden mehrere Experimente in der Durchführung durch Aggregation der Mischungen aus **45** und 14-3-3 $\zeta$  limitiert. Die Oberfläche von 14-3-3 $\zeta$  weist zahlreiche azidische Aminosäure-Reste auf, somit ist eine mehrfache Bindung von **45** nicht auszuschließen.

Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur die Ausbildung ionischer Wechselwirkungen den Oberflächenerkennungsprozess steuert, sondern auch die Bildung von Wasserstoffbrücken. Dies wird neben den Experimenten mit den Arginin- und Lysinanaloga von **45**, die vollständig protoniert vorliegen und dennoch kaum Effekt zeigen, deutlich, als auch durch den Austausch von Phenylalanin gegen Tryptophan in der Seitenarmsequenz. Vierarmige Liganden mit den Seitenarmsequenzen GKW-GCP (**76**) und das Argininanalogon GKWR (**75**) weisen vergleichbare stabilisierende Eigenschaften zu **45** auf; GCP scheint hier sogar weniger Einfluss zu nehmen. Neben der Wahl der Aminosäuren ist auch die Anordnung in der Sequenz von Bedeutung. Der Positionswechsel von Lysin und Phenylalanin reduzierte die stabilisierende Wirkung des Liganden **62** soweit, dass ein ähnlicher Effekt wie bei dem Arginin-tragenden Liganden **72** bzw. dem zweiarmigen Liganden **58** beobachtet werden konnte.



**Abbildung 74.** Übersicht des stabilisierenden Effekts multivalenter Liganden auf die 14-3-3ζ/C-RAF-Wechselwirkung.

Die Bedeutung des Grundgerüsts der Liganden blieb bisher unberücksichtigt und ist sicherlich ebenfalls eine wichtige Stellgröße zu ihrer Verbesserung. Bindungsort und Selektivität sollten in Hinblick auf eine optimierte Stabilisierung in das zukünftige Ligandendesign ebenfalls miteinbezogen werden. Auch ist nicht geklärt, ob ein kooperativer Effekt – negativ oder positiv – durch die multivalenten Liganden hervorgerufen wird oder werden kann. Zudem ist es wichtig,

geeignete Messmethoden für Untersuchungen der 14-3-3ζ-Wechselwirkungen mit den vollständigen (nicht nur fragmental vorliegenden) Interaktionspartnern und insbesondere für die ternären Komplexe *in vitro* und *in vivo* zu finden, zu entwickeln oder anzupassen.



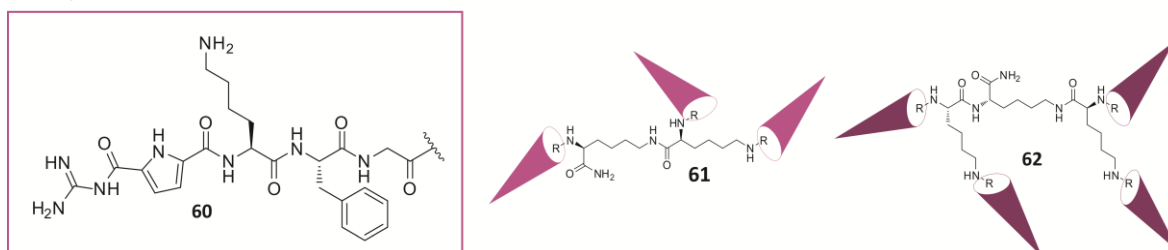
### 4.3. Multivalente Liganden als Transfektionsvektoren

Es konnte schon in vorhergehenden Studien gezeigt werden, dass multivalente Liganden in der Lage sind DNS zu binden und dass peptidische Liganden angereichert mit GCP-Einheiten gute Transfektionsvektoren sind. Um zu testen, ob das Konzept der Kombination multivalenter Liganden mit der künstlichen Anionenerkennungseinheit GCP auch in einem weiteren biologischen Themengebiet anwendbar ist, wurde als Zielmolekül DNS ausgewählt. Mit Hilfe der multivalenten Liganden sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Können die multivalenten Liganden DNS binden und Zellen transfizieren?
- Hat die Anzahl der Seitenarme einen Einfluß auf die Bindungsstärke der Liganden an DNS?  
Ist der Einfluss übertragbar auf den Transportprozess von DNS in Zellen?
- Kann GCP gewinnbringend in den Transfektionssprozess mit einbezogen werden?
- Welchen Einfluss nimmt der Aufbau und die Wahl der Aminosäuresequenz der Peptide

Die hier verwendete Leitsequenz (**60**) der multivalenten Liganden (Glycin-Phenylalanin-Lysin-GCP) leitet sich direkt von Vektoren ab, die von *Kuchelmeister*<sup>[465]</sup> und *Junghänel*<sup>[466]</sup> entwickelt wurden. Somit sind die Untersuchungen der Liganden nicht nur direkt mit den vorhergehenden Studien vergleichbar, sondern auch auf vierarmige Systeme erweiterbar. Es wurden zunächst der dreiarmlige Ligand **61** und der vierarmige Ligand **62** untersucht. Die Synthese der multivalenten Liganden wurde bereits in Abschnitt 4.1. vorgestellt.

Leitsequenz



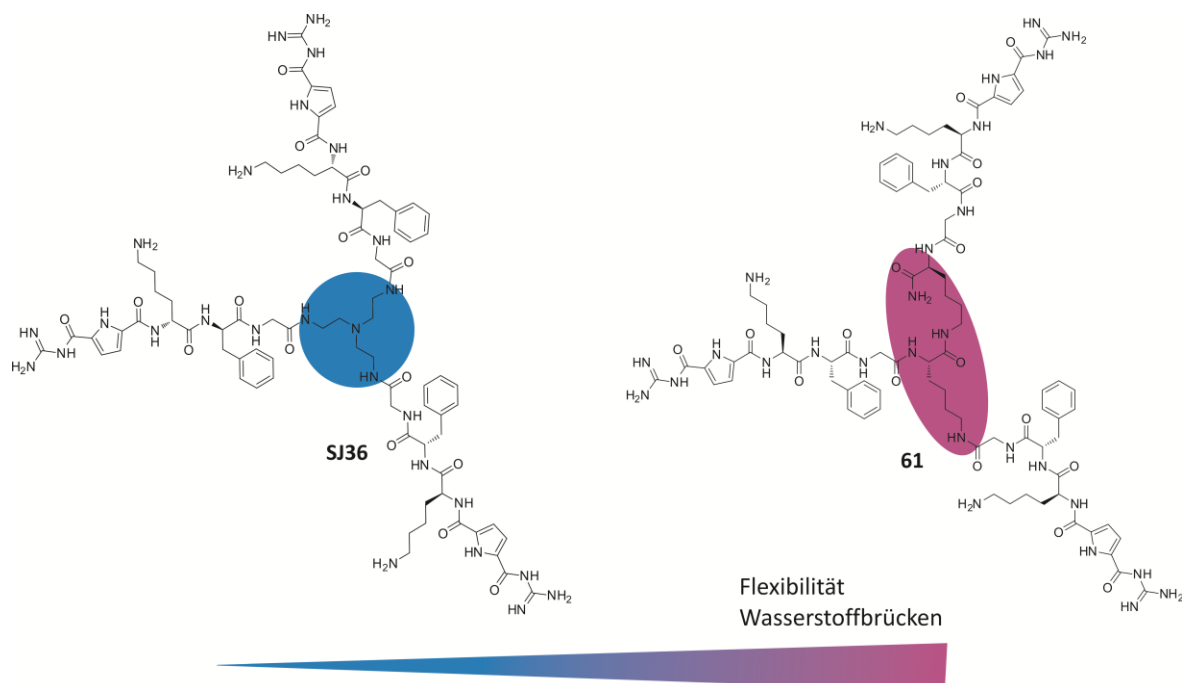
**Abbildung 75.** Die multivalenten Liganden **61** und **62**. Die Leitsequenz (**60**) der Seitenarme besteht aus Glycin, Phenylalanin, Lysin und GCP.

#### 4.3.1. Multivalente Liganden

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu dem dreiarmligen Liganden **61**, wurde als Vergleichsverbindung **SJ36** von *Sandra Junghänel* für erste Untersuchungen mit ctDNS ausgewählt. Die Gentransfektionsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit *Sandra Junghänel* und *Sandra Bäcker* in der Arbeitsgruppe von *Shirley Knauer* in der Mikrobiologie der UDE durchgeführt.

Die Vergleichsverbindung **SJ36** weist analog zu Ligand **61** drei Seitenarme auf, die für beide Liganden identisch sind und aus der peptidischen Sequenz Glycin-Phenylalanin-Lysin sowie einer terminalen GCP-Einheit bestehen. Die drei Arme von **SJ36** werden über ein symmetrisches Tris(2-

aminoethyl)amin (Tren)-Grundgerüst miteinander verknüpft, wie in Abbildung 76 dargestellt. Im Vergleich dazu besteht das Grundgerüst von Ligand **61** aus unsymmetrisch verbundenen Lysinen, wodurch **61** eine höhere konformative Flexibilität als **SJ36** aufweist, andererseits aber auch durch eine höhere Anzahl an Amidbindungen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren für mögliche Interaktionen mit DNS zur Verfügung stellt.



**Abbildung 76.** Die Liganden **SJ36** (links) und **61** (rechts) weisen identische Seitenarme bestehend aus Gly, Phe, Lys und terminal GCP auf und unterscheiden sich im Grundgerüst. **SJ36** hat ein Tren-Grundgerüst wodurch der Ligand zwar eine gewisse Flexibilität aufweist, jedoch auch symmetrischer ist. Durch die Verwendung des Lysingrundgerüsts erhält man neben einer höheren Flexibilität auch mehr Möglichkeiten Wasserstoffbrücken auszubilden.

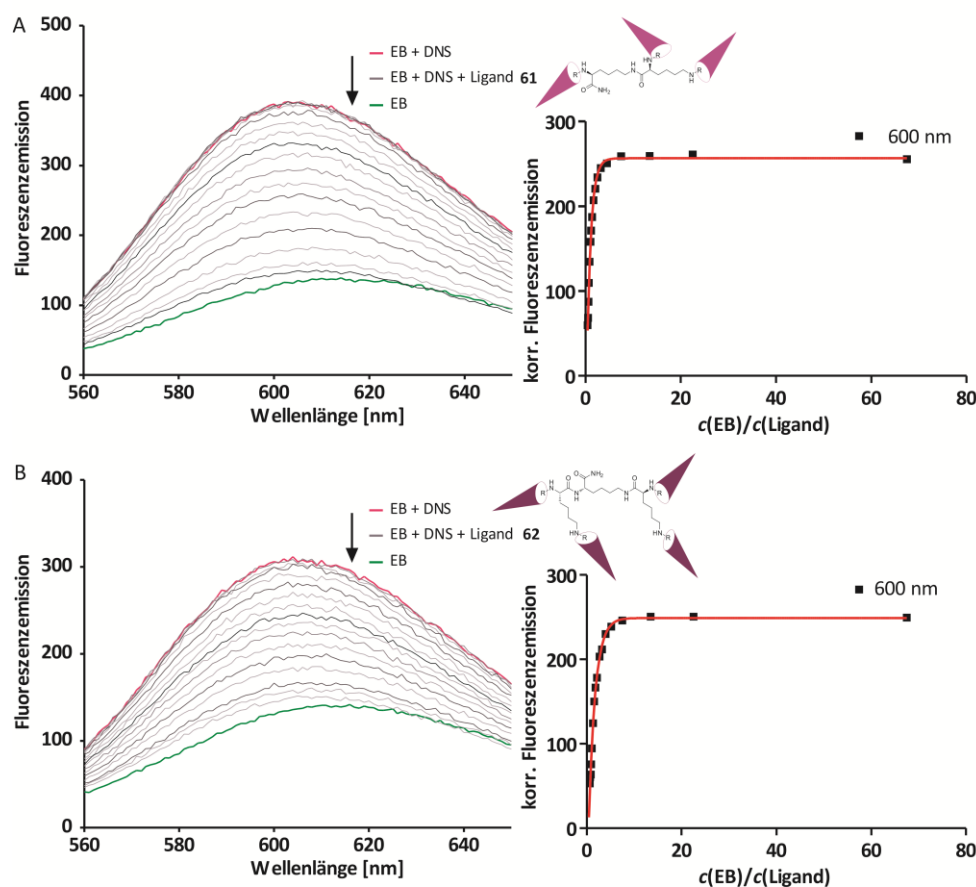
Um direkt erste vergleichbare Erkenntnisse zu dem Einfluss verschiedener Anzahl der Seitenarme zu erhalten, wurde zusätzlich Ligand **62** untersucht. Dieser ist das vierarmige Analogon zu Ligand **61**, und es wäre zu erwarten, dass der vierarmige Ligand aufgrund der zusätzlichen Interaktionseinheiten noch bessere DNS-Bindungseigenschaften aufweist. Erste DNS-Bindungsstudien wurden von *Sandra Junghänel* durchgeführt.

#### 4.3.1.1. DNS-Bindungsuntersuchung

Der fluoreszente Phenanthridinfarbstoff Ethidiumbromid (EB) ist ein bekannter DNS-Interkalator, der sich zwischen jedes dritte bis vierte Basenpaar der DNS einlagert, wodurch sich dessen Fluoreszenzemission bei der Wellenlänge von 600 nm um das ca. 100-fache erhöht.<sup>[534–536]</sup> Die Dissoziationskonstante des EB/DNS-Komplexes von ca. 3-15  $\mu\text{M}$  wurde mittels ITC und UC/Vis-Spektroskopie bestimmt.<sup>[536,537]</sup> Fügt man eine Verbindung hinzu, die EB aus dem Komplex mit der DNS verdrängen kann - wobei der genaue Bindungsmodus der Verbindung an die DNS hier nicht

geklärt wird - erhält man indirekt Informationen über die Bindungsaffinität der Verbindung zu der gewählten DNS.<sup>[538]</sup> Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Werte nur untereinander für das gleiche Nukleotid sowie für gleiche Assaybedingungen vergleichbar sind.

Der EB-Verdrängungsassay wurde hier mit 3  $\mu\text{M}$  ctDNS und 0.75  $\mu\text{M}$  EB in Cacodylat-Puffer (0.01 mM, pH 7.0) durchgeführt. Nach Bestimmung der Fluoreszenzemission von EB alleine, wurde die Probe mit der ctDNS versetzt, für 5 Minuten inkubiert und erneut die Fluoreszenzemission gemessen, was zu einem Anstieg der 600 nm-Fluoreszenz um das 250-fache führte. Zu dem EB/DNS-Komplex wurde in verschiedenen Aliquoten der jeweilige Ligand titriert, was zu einer Abnahme der Fluoreszenzemissionen führte. In Abbildung 77 sind die gemessenen Fluoreszenzemissionen von EB alleine (grüne Kurve), dem Komplex aus EB und ctDNS (rote Kurve) und den jeweiligen Mischungen aus EB/DNS und den Aliquoten der Liganden **61** und **62** (graue Kurven) gegen die jeweilige Wellenlänge grafisch aufgetragen. Durch Auftragung der um die Eigenfluoreszenz korrigierten Emissionswerte bei 600 nm gegen das Verhältnis der Konzentrationen von EB und Ligand sowie nicht-linearer Anpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung können so die  $\text{EC}_{50}$ -Werte der Liganden bestimmt werden.



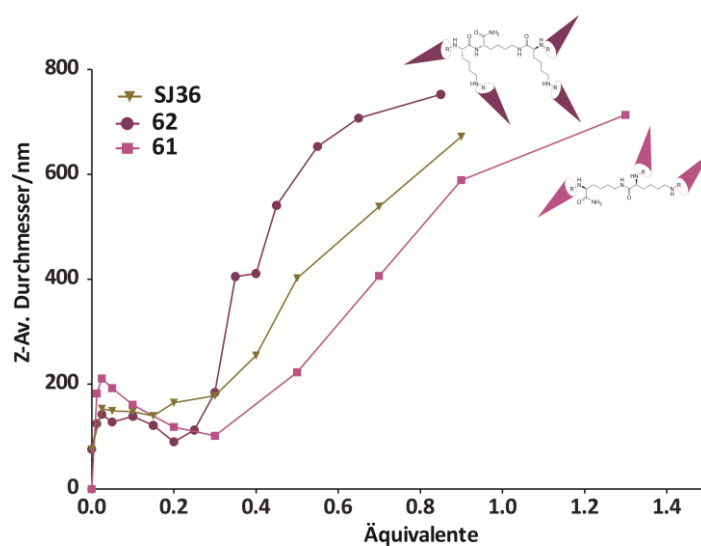
**Abbildung 77.** EB-Verdrängungsassay: A) von Ligand **61** und B) von Ligand **62**. Links sind jeweils die Titration der Liganden zu dem Komplex aus EB und ctDNS abgebildet, rechts die jeweiligen Werte bei 600 nm mit entsprechender Korrektur für die Eigenfluoreszenz von EB.



**Tabelle 12.** Ergebnisse des EB-Verdrängungsassays mit  $c(\text{EB}) = 0.75 \mu\text{M}$  und  $c(\text{ctDNS}) = 3 \mu\text{M}$ 

Ligand	$\text{EC}_{50} [\mu\text{M}]$
<b>SJ36</b>	$1.25 \pm 0.08$
<b>61</b>	$1.11 \pm 0.15$
<b>62</b>	$0.68 \pm 0.08$

Die Konzentrationen der Liganden, die erforderlich sind, um die Hälfte des Ethidiumbromids aus der DNS zu verdrängen, sind in Tabelle 12 aufgelistet. Alle Liganden sind in der Lage EB aus dem Komplex mit DNS zu verdrängen, was gleichzeitig bedeutet, dass die Liganden alle an DNS binden können. Hierbei zeigen sich für die Vergleichsverbindung **SJ36** und Ligand **61** im Rahmen der Messfehler identische Werte. Von Ligand **62**, der vierarmigen Verbindung, ist nur ca. die Hälfte der Konzentration der dreiarmigen Liganden nötig. Allerdings muss bei dem Verdrängungsassay berücksichtigt werden, dass nur Werte mit einem Unterschied von einer Größenordnung wirklich aussagekräftig sind, so dass bei diesen Werten immer noch von einer vergleichbaren Bindungsaffinität der Liganden zu ctDNS gesprochen werden kann. Dies spiegelt sich auch in den DLS-Messungen (Abbildung 78) der Liganden wider, die zeigen, dass alle drei Verbindungen bei einer Zugabe von ca. 0.2 Äquivalenten die DNS zu kleineren Aggregaten zu kondensieren vermögen.

**Abbildung 78.** Hydrodynamischer Durchmesser der Ligand/DNS-Komplexe in Abhängigkeit der Zugabe der Liganden **61** und **62** im Vergleich zu **SJ36** (grün).

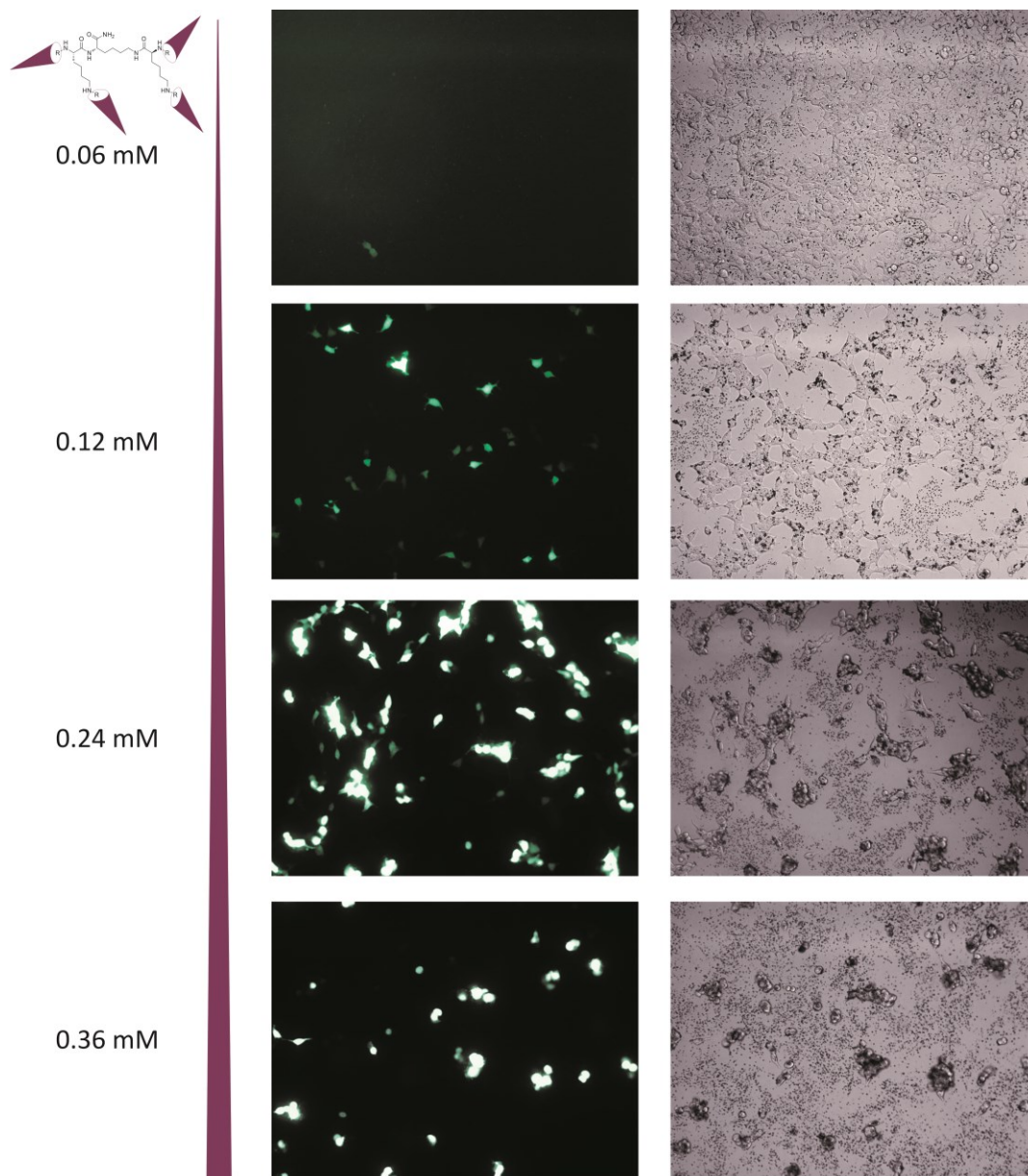
Die ersten Untersuchungen zu den DNS-Bindungseigenschaften von **61** und **62** im Vergleich zu **SJ36** zeigen ähnliche Affinitäten der drei Liganden zu ctDNS. Sowohl das Grundgerüst als auch die Anzahl der Seitenarme scheint wider der Erwartung keinen größeren Einfluss auf die DNS-Bindungseigenschaften zu nehmen. Interessant scheint nun, ob sich auch ein entsprechendes Verhalten bei den Transfektionseigenschaften der Liganden wiederfinden lässt.

#### 4.3.1.2. Transfektionsuntersuchung

In einem Transfektionsexperiment wurde überprüft, ob die Liganden **61** und **62** im Vergleich zu **SJ36** ebenfalls in der Lage sind, nicht nur DNS zu binden und zu kondensieren, sondern diese auch als Transporter in Zellen zu bringen. Getestet wurde dies mit HEK293T (*human embryonic kidney*) Zelllinien. Als Transportgut wurde das Plasmid, welches das grünfluoreszierende Protein (GFP) kodiert, verwendet. Für den Transfektionsassay wurden Ligandenlösungen unterschiedlicher Konzentration (0.06, 0.12, 0.24 und 0.36 mM) mit dem GFP-Plasmid versetzt und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten zu den Zellen gegeben. Bei erfolgreicher Transfektion ist die Zelle dann in der Lage aus dem Plasmid das grün fluoreszierende Protein zu bilden. Nach jeweils 24 und 48 Stunden wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und jeweils eine Hellfeld- als auch eine Fluoreszenzaufnahme aufgenommen. Als Vergleichsubstanzen wurde kommerziell erhältliches Polyethylenimin (PEI) und/oder Lipofectamin (Lipo) verwendet. Die Zellen wurden anschließend manuell ausgezählt, um den Anteil der transfizierten Zellen zu bestimmen.

Nach 24 Stunden wies PEI eine Transfektionseffizienz von 25 % auf. Für keine der verwendeten Konzentrationen des dreiarmligen Liganden **61** konnten transfizierte, also grünfluoreszierende Zellen, gefunden werden. Das gleiche galt für den vierarmigen Liganden **62** bei der niedrigsten Konzentration (0.06 mM). Bei höheren Konzentrationen von Ligand **62** wurde in der Tat Transfektion beobachtet. Die Transfektionseffizienzen wurde zu 12 % und 63 % bestimmt, bei Konzentrationen von 0.12 mM bzw. 0.24 mM, was 2.5-fach über dem Wert von PEI liegt.

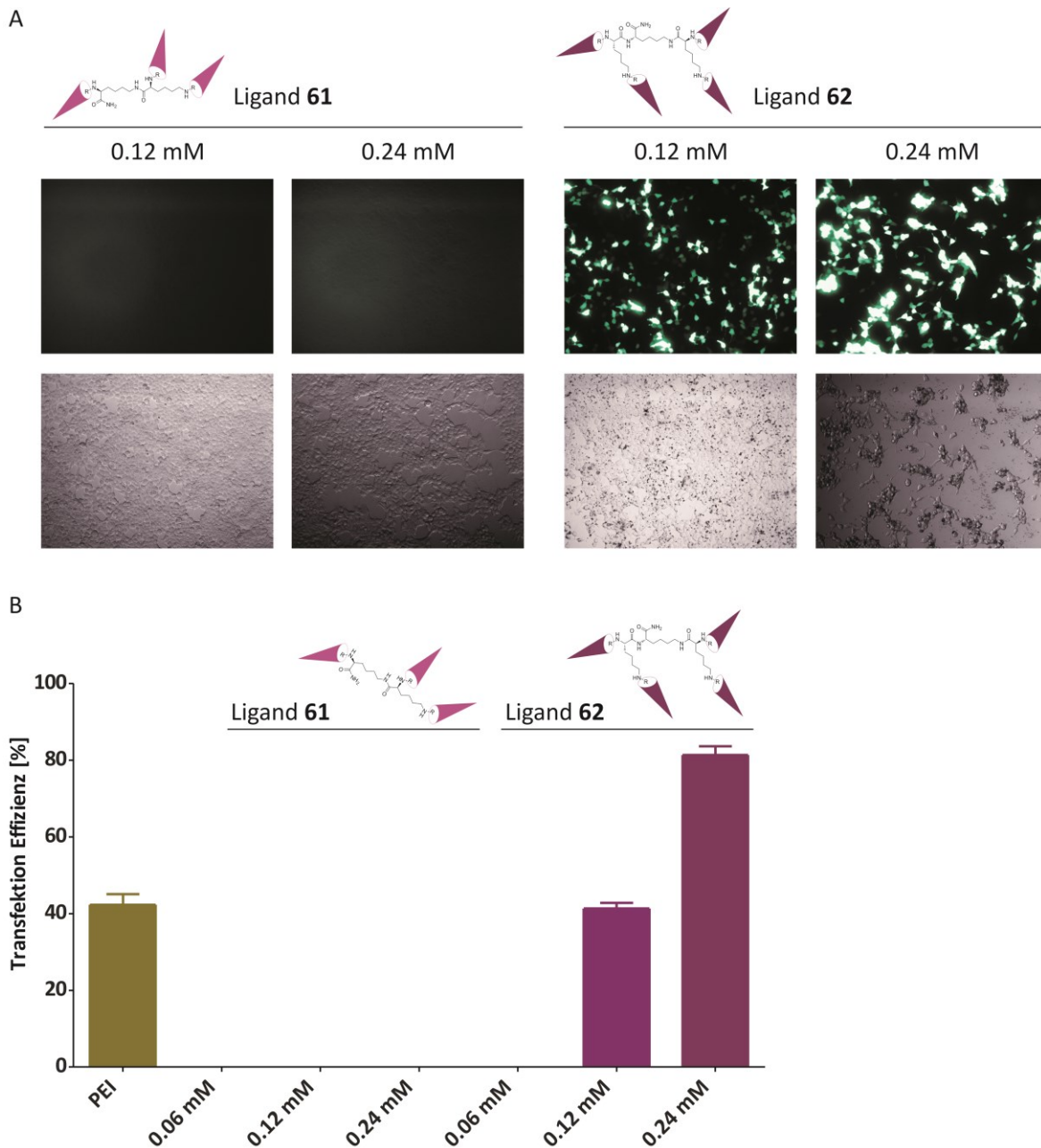
Für **62** scheint also eine minimale Konzentration von 0.12 mM für eine merkbare Transfektion nötig zu sein. Die Transfektion steigt mit steigender Konzentration an, doch beginnen bei 0.24 mM **62** die Zellen bereits zu aggregieren. Wird die Konzentration von **62** auf 0.36 mM erhöht, sinkt aufgrund der Aggregation die Transfektionseffizienz auf 47 %. Wie in Abbildung 79 zu erkennen ist, liegen die Zellen bei dieser Konzentration relativ stark aggregiert vor. Auf der gesamten Oberfläche sind gleichmäßig verteilte kleine Partikel erkennbar, die ausgefallene Komplexe aus Ligand und DNS sein könnten. Ähnliche Partikel fanden *Nakamura et al.* bei ihren Transfektionuntersuchungen von Fullerenderivaten.<sup>[539]</sup> Zudem ist von PEI beispielsweise bekannt, dass es zu großen Teilen ungebunden vorliegt (wird es im Überschuss eingesetzt).<sup>[540,541]</sup> Die Aggregation der Zellen könnte vielleicht dadurch verursacht werden, dass Zellmembranbestandteile wie Phospholipide oder Glykosaminoglykane mit den überschüssigen polykationischen Liganden wechselwirken.<sup>[542]</sup> Ob diese Wechselwirkung vielleicht selektiv ist und für das zellspezifische Ansteuern ausgenutzt werden könnte, bleibt herauszufinden. Der Überschuss der Verbindungen kann auch vorteilhaft sein. Man geht davon aus, dass die gebildeten Partikel durch die elektrostatische Abstoßung der positiven Ladung stabilisiert werden.<sup>[406,541]</sup> Letztlich wird hier jedoch die Auszählung der Zellen erschwert und die Resultate sind nur bedingt vergleichbar. Dennoch scheinen die Zellen intakt und transfiziert zu sein.



**Abbildung 79.** Konzentrationsabhängige Transfektion von **62** nach 24 h. Für die Transfektion scheint eine Minimumkonzentration von 0.12 mM nötig zu sein, bei höheren Konzentration fangen die Zellen an zu aggregieren.

Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert und nochmals am Fluoreszenzmikroskop untersucht, die Hellfeld- und Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 80 zu sehen. Auch nach 48 Stunden zeigte der dreiarmlige Ligand **61** überraschenderweise keinerlei transfizierende Eigenschaften. Dies ist bemerkenswert, da sich der Ligand wie eingangs beschrieben, nur durch das flexiblere, unsymmetrische Grundgerüst von **SJ36** unterscheidet. **SJ36** weist unter vergleichbaren Bedingungen bei einer Konzentration von 0.24 mM eine Transfektionseffizienz von ca. 50 % auf. Da die Seitenarme von **SJ36** und **61** identisch sind, kann dieses unterschiedliche Verhalten nur auf das verwendete Grundgerüst zurückzuführen sein. Erhöht man die Anzahl der Arme, kann wieder eine Transfektion, vergleichbar mit der von PEI (33 %) beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 0.12 mM weist **62** eine Transfektionseffizienz von 27 % auf und bei 0.24 mM eine von 72 %. Der Einfluss des Grundgerüsts, der sich bei **61** negativ auf das Transfektionsvermögen auswirkt, kann

anscheinend durch die Erhöhung der Anzahl der Arme und somit der Multivalenz ausgeglichen werden.



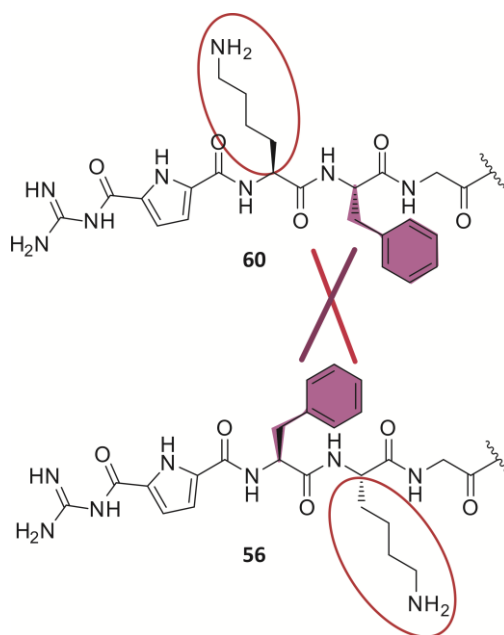
**Abbildung 80.** Ergebnisse der Transfektionsexperimente der Liganden **61** und **62** nach 48 h. A) Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenz- und die Hellfeldaufnahmen bei 0.12 mM und 0.24 mM. B) Auftragung der Transfektion-Effizienz.

Dadurch zeigt sich eindrucksvoll das Potential multivalenter Liganden. Da in den vorhergehenden DNS-Bindungsstudien für die Liganden keine Unterschiede festgestellt werden konnten, deutet das beobachtete Transfektionsverhalten der Liganden auf unterschiedliche Eigenschaften im Transfektionsprozess selbst hin. Denkbar wären die Überwindung der Zellmembran, oder, nimmt man den endosomalen Aufnahmemechanismus an, das Entkommen aus

dem Endosomen. In diesem Falle könnte tatsächlich die Anzahl der GCP-Gruppen eine Rolle bei der Pufferwirkung der Liganden spielen.

Die ersten Transfektionsstudien zeigen, dass der dreiarmlige Ligand **61** wider Erwarten nicht dazu in der Lage ist Zellen zu transfizieren. Die Vergleichsverbindung **SJ36**, die sich nur durch das Grundgerüst von **61** unterscheidet, ist ein effizienter Transfektionsvektor. Erst die Erhöhung der Bindungsmultivalenz, die zu dem vierarmigen Liganden **62** führte, hatte zur Folge, dass die Zellen transfiziert wurden; dabei ist **62** ca. doppelt so effizient wie der Goldstandard PEI. Im Vergleich zu **61** weist **62** also eine erhöhte Bindungsmultivalenz auf. Dieser Unterschied scheint darüber zu entscheiden, ob der Ligand ein Transfektionsvektor ist oder nicht.

Ausgehend vom vierarmigen Liganden **62** schien es interessant zu prüfen, ob und welchen Einfluss eine Veränderung der Seitenarmsequenz zur Folge hat. Daher wurde zunächst der vierarmige Ligand **45** untersucht, bei dem die Reihenfolge der Aminosäuren Lysin und Phenylalanin gegenüber **62** vertauscht sind. Beide Ligandseitenarme sind in Abbildung 81 dargestellt.

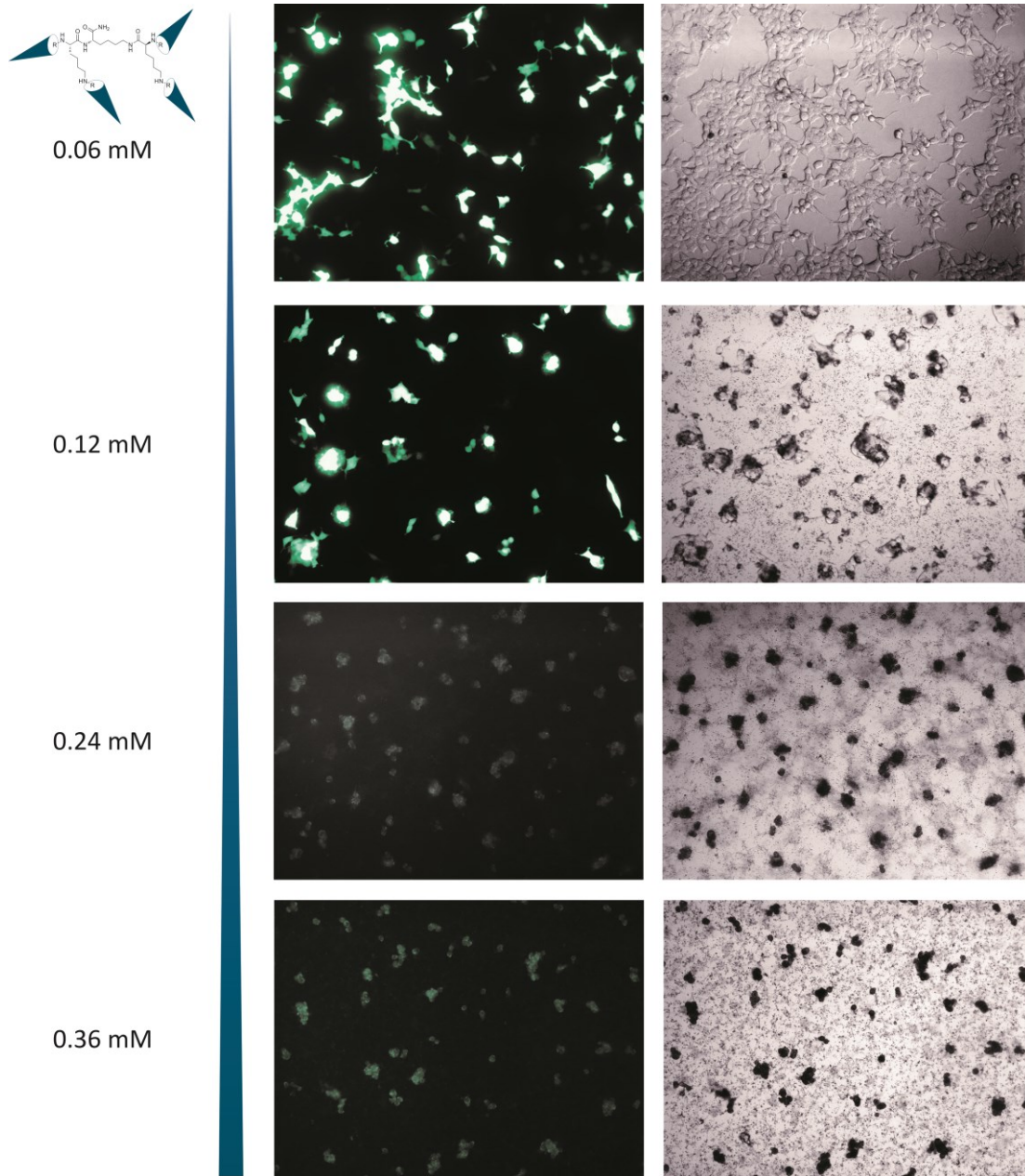


**Abbildung 81.** Seitenarme der Liganden **62** (oben) und **45** (unten), bei denen die Reihenfolge der Aminosäuresequenz von Phenylalanin und Lysin vertauscht ist.

Nach 24 h zeigt Ligand **45** schon bei der niedrigsten angewendeten Konzentration von 0.06 mM eine gute Transfektionseffizienz von 23 %, d. h. vergleichbar mit den Werten von PEI (25 %). Allerdings zeigte sich bei den konzentrationsabhängigen Transfektionsstudien, dass die Zellaggregation schon bei einer Konzentration von 0.12 mM von **45** auftritt. Auch hier sind wieder die kleinen Partikel auf der gesamten Well-Oberfläche verteilt. Nach 48 h lag die Transfektionseffizienz von **45** unverändert bei 24 %, betrug also nur noch knapp die Hälfte der Effizienz von PEI (42 %). Bei höheren Konzentration von **45** sind die Zellen entweder stark aggregiert oder sogar beschädigt. In Abbildung 82 ist nur noch ein verblassendes, grünliches Restleuchten der Zellen zu erkennen, was darauf hindeuten könnte, dass die Zellen zwar anfänglich vom Liganden



transfiziert wurden, aber nach längerer Exposition auch Schaden genommen haben. Vielleicht bindet der Ligand so stark die DNS, so dass die Komplexe vor Eintritt in die Zelle im Medium ausfallen. Dies müsste noch mittels DNS-Bindungsstudien überprüft werden.



**Abbildung 82.** Konzentrationsabhängige Transfektion von 45 nach 48 h.

Um zu testen, ob dieses Verhalten durch eine Reduktion der möglichen Wechselwirkungsstellen unterdrückt werden kann, wurden analoge zwei- und einarmige Verbindungen (Abbildung. 83) auf ihr Transfektionsvermögen hin getestet.

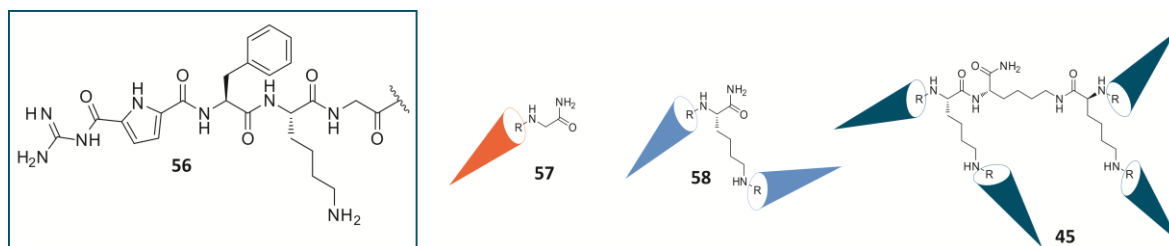


Abbildung 83. Multivalente Liganden **57**, **58** und **45**.

Die Transfektion der multivalenten Liganden **57**, **58** und **45** wurden ebenfalls bei verschiedenen Konzentration durchgeführt. In Abbildung 84 sind nur die experimentellen Beobachtungen für die beiden Konzentration abgebildet, bei denen die Liganden einen Effekt zeigten. Zum Vergleich sind die entsprechenden Bilder des jeweils anderen Liganden gezeigt.

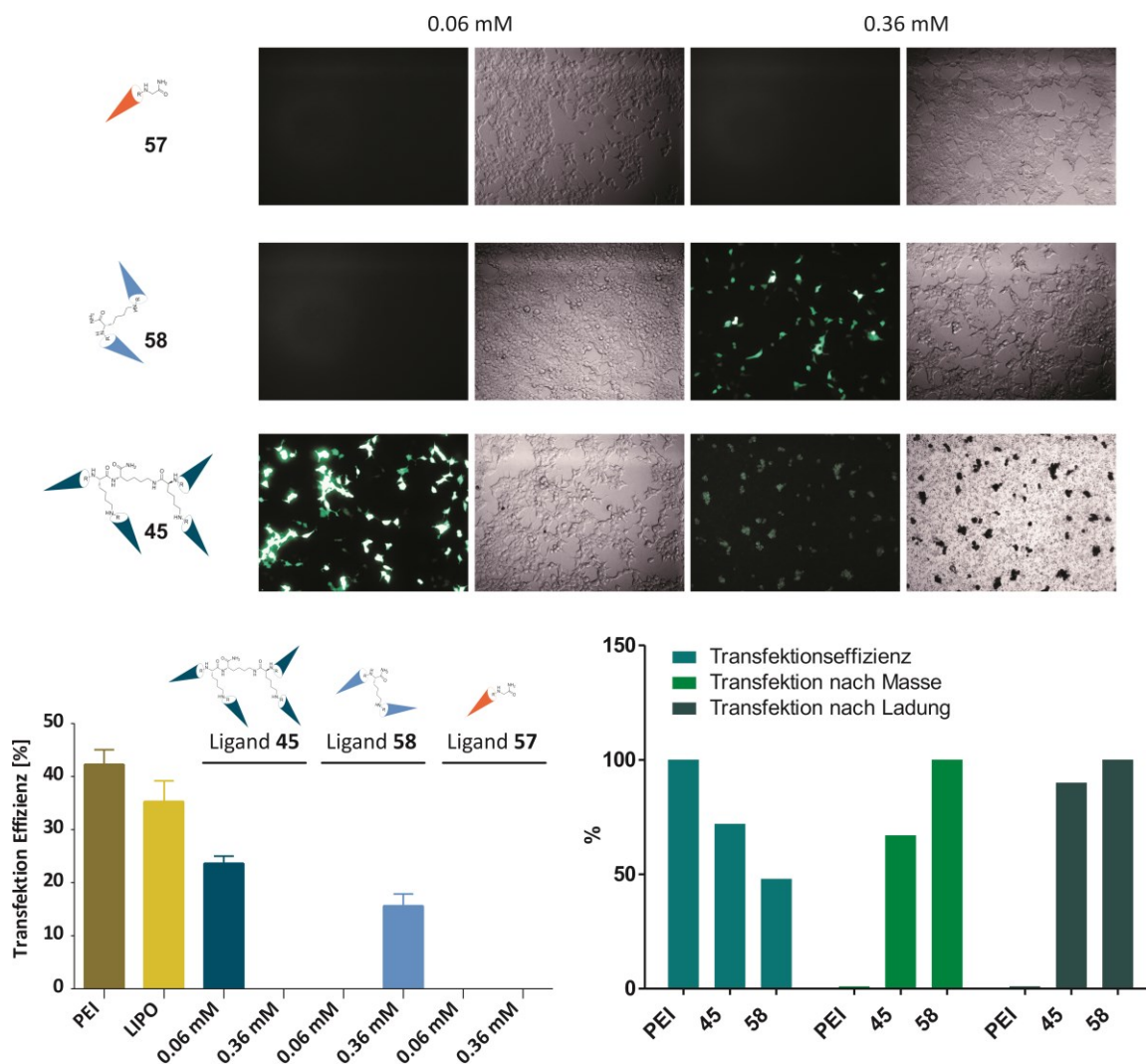


Abbildung 84. Transfektion der Liganden **57**, **58** und **45** nach 48 h. Aufgetragen sind die Transfektionseffizienzen bei verschiedenen Konzentrationen und jeweils bezogen auf den höchsten Wert der einzelnen Verbindungen nach Masse und Ladung.

Nach 24 h Inkubation wies nur Ligand **45** ein Transfektionsvermögen (23 %) auf. Die Transfektion war nach weiteren 24 h nicht weiter erhöht, was darauf hindeutet, dass die Zellen möglicherweise Schaden genommen haben. Nach 48 h Inkubationszeit zeigte auch der zweiarmige Ligand **58** eine Transfektion (Effizienz von 16 %), d. h. **58** ist ca. halb so effizient wie PEI (42 %) oder LIPO (35 %).

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der Ligand mit ca. 1.2 kDa wesentlich kleiner als PEI (25 kDa) ist und auch nur 2.6 positive Ladungen aufweist. Wie in Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben, besitzt die GCP-Einheit einen  $pK_s$ -Wert von 6.6, die Lysin-Einheiten haben einen durchschnittlichen  $pK_s$  Wert von 9–10. Dadurch sind bei den hier verwendeten Bedingungen (0.01 M Cacodylatpuffer pH 7.0) beide Lysine vollständig, die GCP-Guanidiniumfunktion aber nur zu 28 % protoniert. Gleichzeitig sind die Zellen weder aggregiert noch liegen kleine, dunkle Partikel vor, die auf Komplexe aus DNS und den Liganden hindeuten könnten. Bezogen auf Größe und Ladung weist **58** die höchsten Transfektionseffizienzen auf, die ca. 10- bzw. 90-fach über denen von PEI liegen. Die einarmige Verbindung **57** zeigt unter den verwendeten Assaybedingungen keine Transfektionseigenschaften. Somit ist hier für die Transfektion mindestens eine Verbindung mit je zwei Lysinen und zwei GCP-Bindungsmotiven nötig.

Interessanterweise zeigte die Verbindung **Li-4** von *Mao Li* bestehend aus zwei Lysinen und zwei GCP-Einheiten in einem vergleichbaren Transfektionsexperiment keinen Effekt.<sup>[463]</sup> Der Ligand ist in Abbildung 85 dargestellt und besteht aus vier hintereinander gekuppelten Lysinen-Einheiten, wobei diese endständig an  $\epsilon$ -NH je mit einem GCP verknüpft sind. **Li-4** ist kleiner und unflexibler als Ligand **58**. Für einen transfizierenden Effekt so fanden *Li et al.* heraus, müssen bei dieser Art Ligand mindestens vier GCP-Einheiten vorliegen. Im Unterschied zu **Li-4** weist **58** zusätzlich zwei Phenylalanin-Einheiten auf. Aromatische Reste wie die Phenylalanin-Einheiten können ebenfalls für die Transfektion wichtig sein, z. B. für die Überwindung der Zellmembran. CPPs können besser in Zellen eindringen wird ihr Tryptophananteil, ebenfalls eine aromatische Aminosäure, erhöht.<sup>[451,543]</sup> Dies könnte bei **58** ebenso von Vorteil für eine erfolgreiche Transfektion sein.

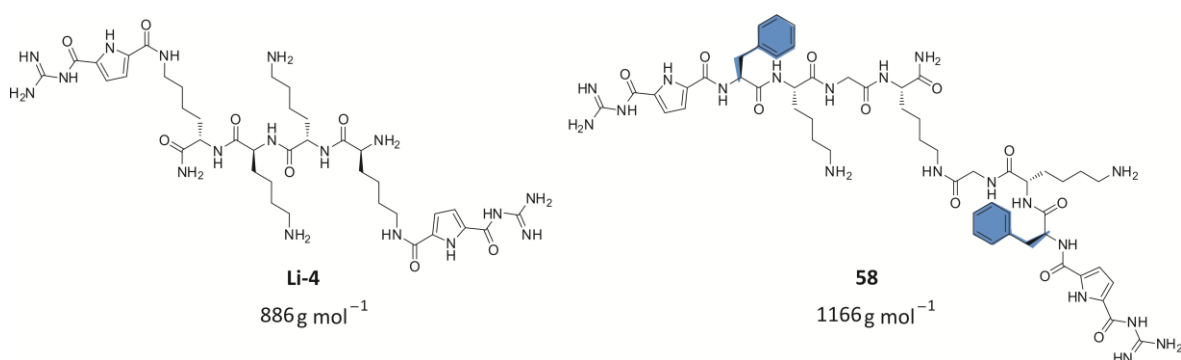
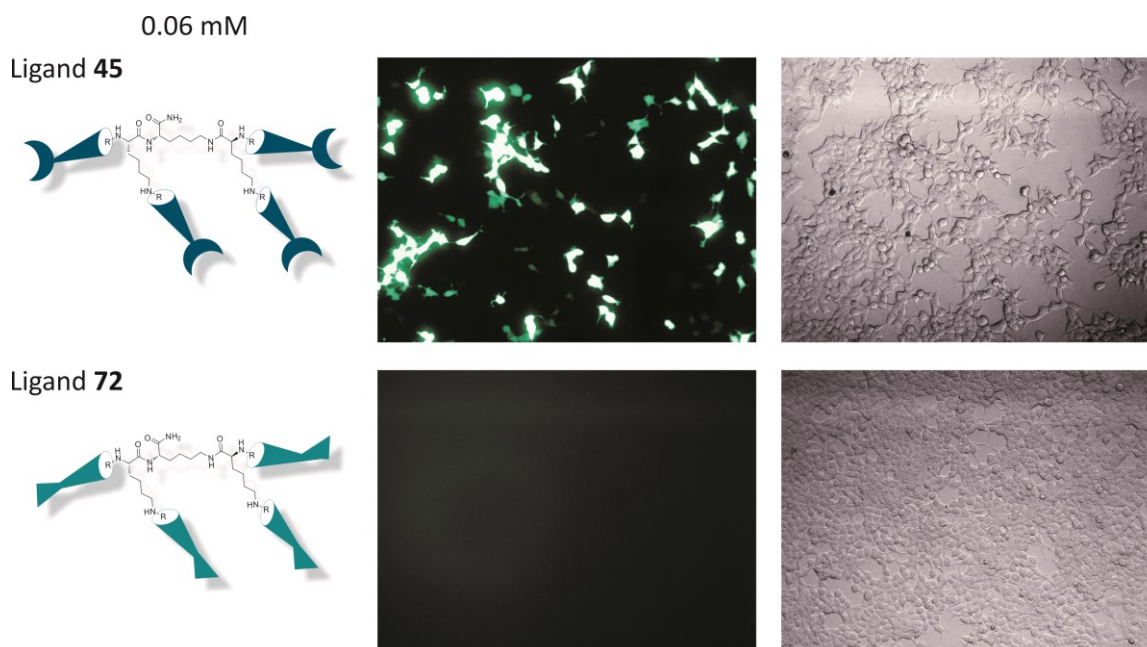


Abbildung 85. Vergleich der Liganden **Li-4** und **58**.



Um einen möglichen positiven Einfluss der GCP-Einheit auf die Transfektion zu testen, wurden Experimente mit Ligand **72**, dem Argininanalogon, durchgeführt. Auch bei höheren Konzentrationen von **72** ist keine Transfektion zu beobachten (s. a. Abbildung 86). Das Transfektionsvermögen von **45** ist somit nur auf die Anwesenheit der GCP-Gruppe zurückzuführen.



**Abbildung 86.** Transfektion von **45** und **72** mit HEK293T Zellen. Im Gegensatz zum Argininanalogon **72**, kann **45** die Zellen erfolgreich mit einer Effizienz von 24 % transfizieren.

#### 4.3.1.3. Zellviabilitätstest

Um zu überprüfen, ob die Liganden zelltoxisch sind, wurde ein Alamar Blue Assay an HeLa-Kyoto Zelllinien durchgeführt. Der Assay zeichnet sich dadurch aus, in der reduktiven Umgebung einer metabolisch aktiven Zelle wirksam zu sein, wodurch Zellproliferation und Zelltoxizitäten getestet werden können. Alamar Blue (Resazurin) ist ein zellgängiger, nicht-fluoreszierender Farbstoff, der durch Reduktion in das leuchtend rot fluoreszierende Resorufin umgewandelt wird.<sup>[544–546]</sup>

Die Zellen wurden mit 0.12 mM **45**, **62** bzw. **72** sowie mit 0.36 mM **58** transfiziert und nach 23 bzw. 47 Stunden mit Alamar Blue versetzt und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 590 nm ausgelesen und mit der Intensität von nicht-transfizierten Zellen verglichen. Die erhaltenen Werte (je Doppelbestimmung) wurden auf diese Kontrollen normiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 87 dargestellt. Dabei zeigte sich nach 24 h, dass mit **45**, **72** bzw. **58** behandelte Zellen etwa gleichauf mit der Kontrollgruppe waren, die mit **62** behandelten sogar eine um das doppelte gesteigerte metabolische Aktivität aufwiesen. Warum die metabolische Aktivität erhöht scheint, ist nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Da nur eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, ist es sinnvoll den Assay zunächst zu wiederholen. Zudem

kann das Ergebnis durch einen weiteren Viabilitäts-Assay, z. B. dem Neutralrot-Assay, verifiziert werden. Bei dem Neutralrot-Assay akkumuliert der verabreichte Farbstoff, der in lebenden Zellen protoniert wurde, nur in ebendiesen Zellen, die lebendig sind.<sup>[547]</sup> An dieser Stelle bleibt also ungeklärt, ob die Liganden auf die Fluoreszenz des Farbstoffes, das Redoxverhalten des Farbstoffes oder den Zellstoffwechsel Einfluss nehmen. Daher sind diese ersten Ergebnisse zur Zellviabilität nur eingeschränkt zu berücksichtigen. Nach 48 h zeigen mit **45** versetzte Zellen eine um knapp die Hälfte verminderte Viabilität, was darauf hindeutet, dass bei längerer Inkubation die Zellen zu Schaden kommen, wie es auch schon in den konzentrationsabhängigen Transfektionsstudien angedeutet worden war. Die Viabilität der Zellen mit **62** ist vergleichbar mit der Kontrollgruppe, mit **72** und **58** scheinen die Zellen metabolisch aktiver zu sein. Dies deutet darauf hin, dass die multivalenten Liganden, bis auf **45**, nicht zelltoxisch sind.

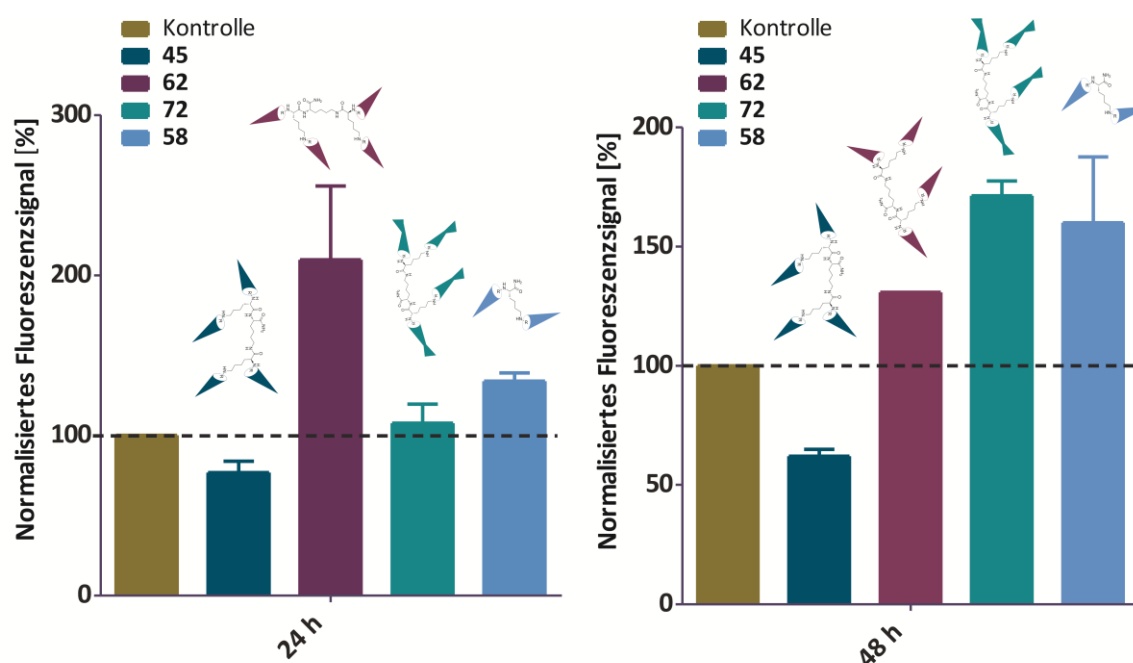


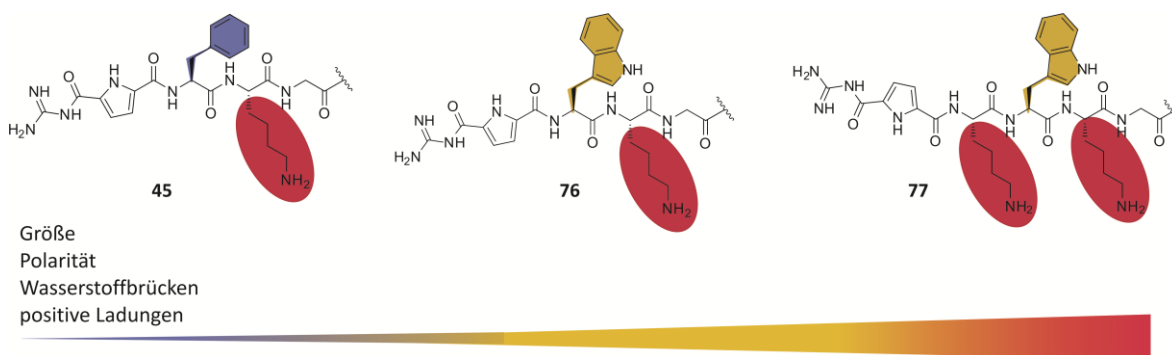
Abbildung 87. Ergebnisse des AlamarBlue Toxizitätstest nach 24 und 48 Stunden.

#### 4.3.1.4. Variation der Peptidsequenz

Da nicht nur die Anzahl der Arme Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Liganden haben kann, sondern auch eine Modifikation der Arme selbst, wurden zwei weitere Liganden untersucht, die beide Tryptophan anstelle von Phenylalanin in der Sequenz aufweisen sowie ein zusätzliches Lysin. Im Vergleich zu Phenylalanin ist Tryptophan größer und polarer. Zusätzlich kann Tryptophan über das Indol-NH Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Die Fähigkeit Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen mit Lysinen oder Argininen bzw. positiv geladenen, funktionellen Einheiten

einzuweisen ist beiden Aminosäuren zuzuschreiben und ist z. B. für die Ausbildung der Sekundärstruktur von Proteinen mit verantwortlich.<sup>[548]</sup>

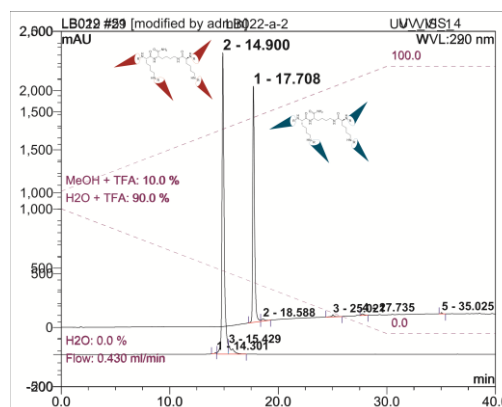
Zudem kann Tryptophan als hydrophobe Aminosäure mit der Zellmembran wechselwirken. Schon das Einfügen von drei Tryptophan-Einheiten kann die zellpenetrierenden Eigenschaften von CPPs verbessern.<sup>[437,455]</sup> Da auch schon eine Erhöhung der Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren am Grundgerüst zu verändertem Verhalten geführt hat, ist hier ebenfalls interessant zu sehen, wie sich die Einführung von Tryptophan auf das DNS-Bindungsverhalten auswirkt. Durch Einbau eines zusätzlichen Lysins vor der terminalen GCP-Einheit, analog zum Liganden **62**, wird die Anzahl der positiven Ladungen im Liganden erhöht, wodurch wiederum eine stärkere Bindung an das Phosphatrückgrat der DNS möglich ist.



**Abbildung 88.** Darstellung der Seitenarme der Liganden **45** (links), **76** (Mitte) und **77** (rechts). Gelb hervorgehoben ist die Aminosäure Tryptophan, die im Vergleich zu Phenylalanin (violett) größer und polarer ist, rot hinterlegt sind die Lysinreste.

Die Modifikationen der Seitenarme sind in Abbildung 88 zusammengefasst. Die Synthese wird in Abschnitt 4.1.4. beschrieben. Ein Vergleich der HPLC-Läufe von **77** und **45** (Abbildung 89) verdeutlicht die höhere Polarität von **77**.

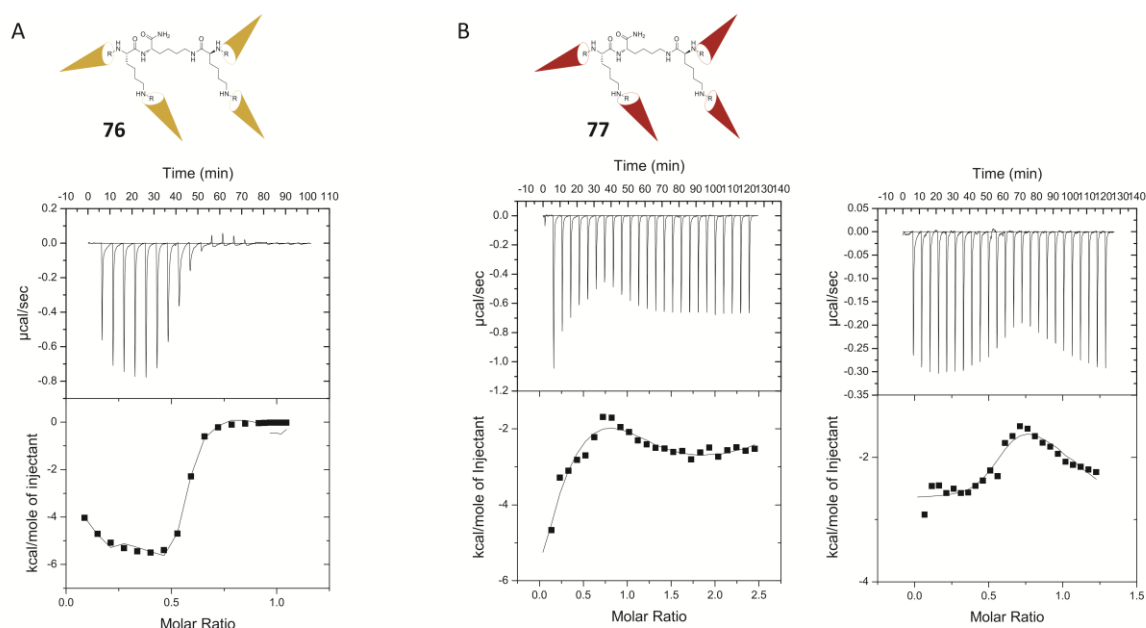
Als nächstes wurde überprüft, ob der Einbau polarer Aminosäuren in die Liganden diese zu besseren DNS-Bindern macht. EB-Verdrängungsassays der Liganden **76** und **77** wurden, wie auf S. 108 ff. beschrieben durchgeführt, um die Konzentrationen der Liganden zu bestimmen, die erforderlich sind, um die Hälfte des Ethidiumbromids aus der DNS zu verdrängen. Ligand **76** weist einen vergleichsweise schlechten  $EC_{50}$ -Wert von  $3.18 \mu M$  auf, ist damit fast 17-fach höher als der  $EC_{50}$ -Wert von **77** ( $0.19 \mu M$ ). Dies deutet darauf hin, dass der



**Abbildung 89.** Überlagerung der HPLC-Läufe von **77** (rot, Peak 2  $t_R = 14.9$  Min) und **45** (blau, Peak 1  $t_R = 17.7$  Min), bei gleichen Laufbedingungen (Gradientenlauf von 10-100% MeOH + 0.05%TFA innerhalb von 30 min)

polarere Ligand **77** und neben zusätzlichen Wasserstoffbrücken auch ionische Wechselwirkung mit der ctDNS eingehen kann und somit eine höhere Bindungsaffinität zur DNS aufweist als **76**. Da der  $EC_{50}$ -Wert von **76** auch viel höher liegt als die der anderen bisher untersuchten Liganden ( $EC_{50}$ -Werte ca. 1  $\mu$ M), scheint der Austausch von Phenylalanin gegen Tryptophan einen negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität zu haben.

Um einen genaueren Einblick in das Bindungsverhalten der Liganden **76** und **77** zu erhalten, wurden ITC-Messungen durchgeführt. Dazu wurden Aliquote von 5  $\mu$ L einer 0.7–1.4 mM ctDNS-Lösung zu den jeweiligen 0.05 mM Ligandlösungen titriert. Alle Experimente wurden jeweils zweifach in 0.01 mM Cacodylatpuffer bei pH 7.0 und 25 °C durchgeführt. Vorab wurden Titrations des Liganden **76** zu ctDNS versucht, die aber zu keinem Ergebnis führten, daher wurden die Titrations invers ausgeführt (Abbildung 90A). Als Kontrollen wurden jeweils die ctDNS-Lösungen in Puffer titriert. Für Ligand **77** konnte unter den gewählten Bedingungen mit keiner der beiden Titrationsvarianten ein aussagekräftiges Ergebnis (Anpassung mit einem *sequential binding site*-Modell,  $n=6$ ) für die erhaltenen Wärmesignale erhalten werden. Die Kurven sind in Abbildung 90B zu sehen. DNS-Bindung und -Kondensation sind komplexe Mechanismen, die nicht zwingend getrennt voneinander ablaufen müssen, wodurch die Interpretation der ungewöhnlichen thermodynamischen Profile erschwert wird.



**Abbildung 90.** ITC-Titrationskurven der Liganden **76** und **77** mit ctDNS. A) ctDNS (0.9 mM) wurde zu Ligand **76** (0.05 mM) titriert. nach Abzug der Verdünnung und des ersten Datenpunktes konnte die Kurve mit einem *two sites*-Modell angepasst werden. B) ctDNS (links 1.4 mM, recht 0.7 mM) wurde zu **77** (0.05 mM) titriert. Nach Abzug der Verdünnung und des ersten Datenpunkts, konnten die Kurven zwar mit dem *sequential binding site* Modell für  $n=6$  angepasst werden, aber die Ergebnisse sind nicht sinnvoll.

Für Ligand **76** konnte die Titrationskurve mit dem *two-site binding*-Modell angepasst werden, wobei der erste Prozess aufgrund des unrealistischen molaren Verhältnisses von 0.006 unbeachtet bleibt. Daher ist in Tabelle 13 nur der zweite Prozess aufgelistet. Die Bindung von **76** an ctDNS ist

mit 71 nM sehr stark, was das Ergebnis des EB-Verdrängungsassays nicht vermuten lässt. Allerdings wird in dem EB-Assay nur indirekt auf die Bindungsaffinität geschaut, aber nicht auf den Bindungsmodus, und er gibt nur an, ob EB aus dem Komplex verdrängt wurde.

**Tabelle 13.** Resultate ITC und EB Verdrängungsassay der Liganden **76** und **77**, n. b. = nicht bestimmbar

Ligand	EC <sub>50</sub> [μM]	K <sub>D</sub> [nM]	n	ΔH [kcalmol <sup>-1</sup> ]	TΔS [kcalmol <sup>-1</sup> ] (T=298 K)	ΔG [kcalmol <sup>-1</sup> ]
<b>76</b>	3.18 ± 0.05	71	0.55	-6.1	3.7	-9.8
<b>77</b>	0.19 ± 0.03	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.

Die Interaktion von Ligand **76** mit ctDNS mit einer freien Gibbs-Energie von  $\Delta G = -9.8 \text{ kJmol}^{-1}$  scheint sowohl enthalpisch als auch entropisch begünstigt zu sein. Der enthalpische Beitrag, der beispielsweise auf die gerichtete Ausbildung von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkung des Liganden zur DNS zurückzuführen ist, wird dabei unterstützt von der gleichzeitigen Freisetzung von Wasser und Gegenionen. Diese Freisetzung wird durch die Bindung des Liganden an die DNS aber wohl hauptsächlich durch die Kondensation der DNS verursacht, was zusätzlich den Verlust der Flexibilität, d. h. rotatorischen Freiheitsgrade, des Liganden durch die Bindung zu kompensieren scheint, so dass der entropische Beitrag insgesamt positiv ist.<sup>[549–551]</sup> Bei Titration der DNS zum Liganden sind alle DNS-Moleküle aufgrund des großen Überschusses des Liganden, wahrscheinlich an den Ligand gebunden. Durch seine polykationisch und multivalente Eigenschaften sowie Ähnlichkeit zu den vorher beschriebenen Molekülen, kann davon ausgegangen werden, dass die DNS zu diesem Zeitpunkt der Titration vollständig kondensiert vorliegt.

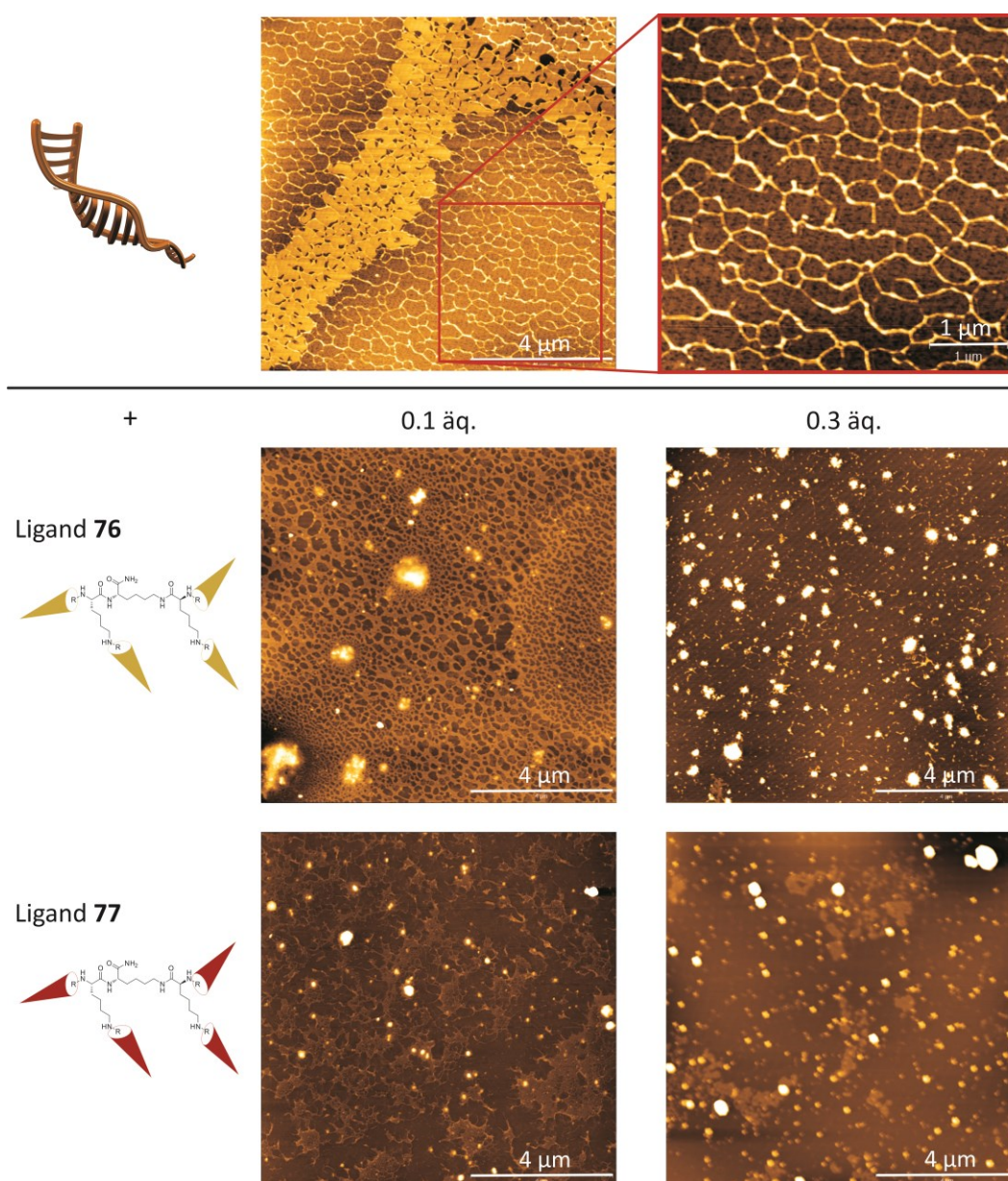
Das Kondensationsvermögen der Liganden wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, *AFM*) untersucht. Das AFM liefert hochauflösende Bilder (bis zu atomarer Ortsauflösung) einer Oberfläche, durch Messung der Kräfte - hauptsächlich Coulomb- und van der Waals-Kräfte, die je nach Abstand repulsiv oder attraktiv sein können - die zwischen der Meßspitze und der Probe auftreten. AFM hat den Vorteil auch nichtleitende Proben betrachten zu können. Die Meßspitze befindet sich an einem als Federarm (*cantilever*) und wird über die Probenoberfläche geführt. Durch die Wechselwirkung mit der Oberfläche ändert sich die dabei wirkende Kraft und die Auslenkung des Arms wird an jeder Position der Oberfläche über einen Laserstrahl auf eine Photodiode reflektiert und kann somit Orts-Koordinaten zugeordnet werden, wodurch ein dreidimensionales Bild entsteht.<sup>[552,553]</sup>

Die zu untersuchenden Proben wurden in einer wässrigen Magnesiumchlorid-Lösung angesetzt, um eine abstoßende Wechselwirkung der negativ geladenen Mica-Oberfläche, die bei der Messung die Probe trägt, und der DNS zu vermeiden. Bei der Untersuchung von ctDNS alleine



finden sich gleichmäßig und unorientiert über die Oberfläche verteilt dünne, lineare, leicht verzweigte Stränge. Die durchschnittliche Höhe dieser Stränge beträgt  $0.9 \pm 0.5$  nm, die Breite  $22 \pm 5$  nm. Dies ist vereinbar mit literaturbekannten Werten von dsDNS (Höhe 0.5–1.5 nm, Breite 12–31 nm)<sup>[554,555]</sup> und deutet auf eine Mischung von doppelsträngiger DNS und kleineren Aggregaten hin.

Die Aufnahmen in Abbildung 91 zeigen, dass bei einer Zugabe von **76** und **77** sich diese Stränge zu kleineren Partikeln mit Durchmessern von 20–40 nm zusammenlagern. *Mann et al.* untersuchten mittels AFM den Kondensationsprozess von DNS durch verschieden lange Lysin- und Arginin-Homopeptide und fanden ebenfalls sphärische Partikel dieser Größe mit zunehmender Kondensation.<sup>[459]</sup> Die Bildung der Partikel scheint konzentrationsabhängig zu sein.



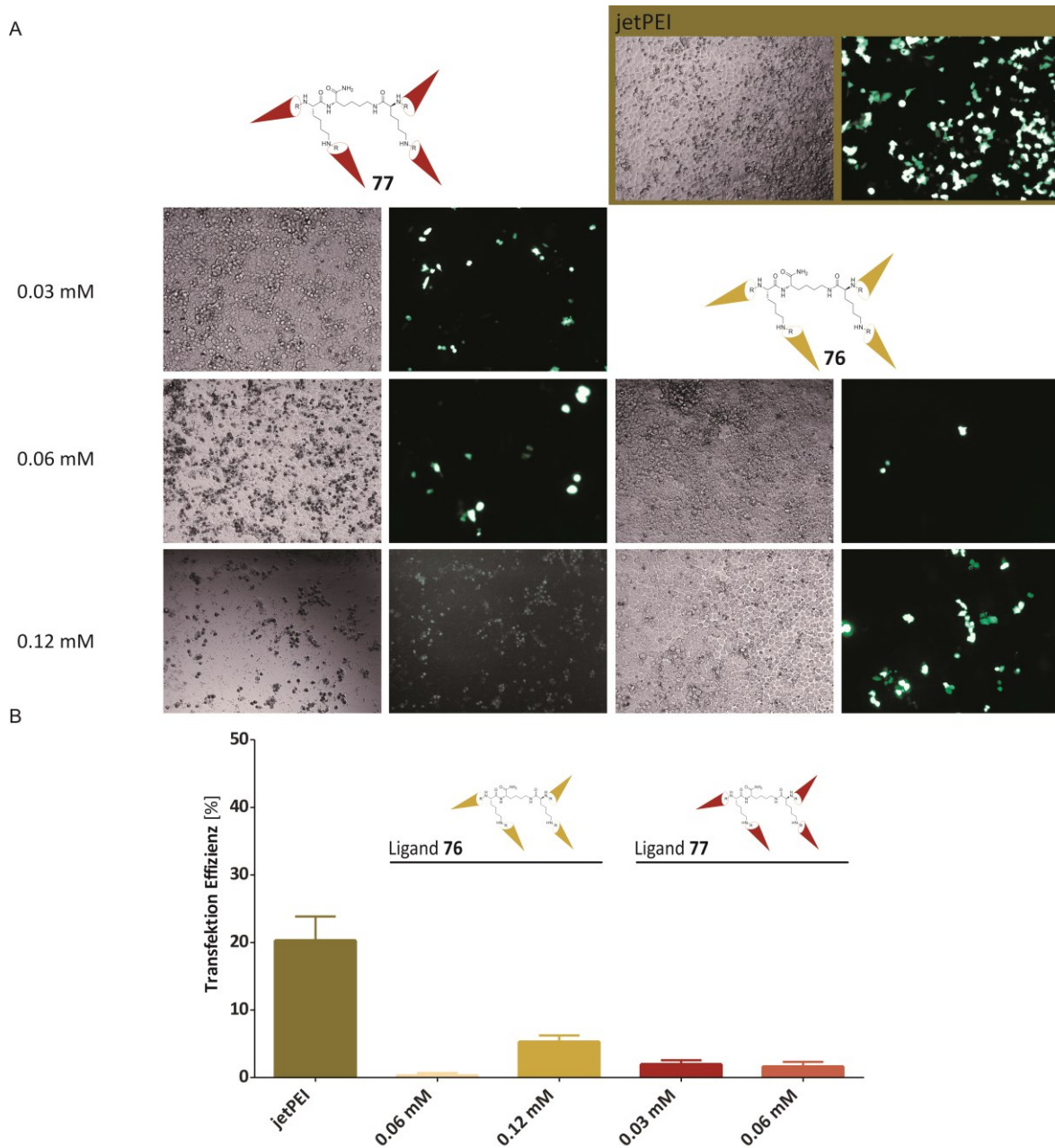
**Abbildung 91.** AFM-Aufnahmen von ctDNS (ganz oben) und jeweils Zugabe 0.1 und 0.3 Äquivalenten von Ligand **76** (Mitte) und Ligand **77** (unten).

Bei einer Zugabe von 0.1 Äquivalenten scheint die Probe mit **76** stärker quervernetzt zu sein. In der Probe mit 0.1 Äq. **77** scheint schon ein erheblicher Teil der DNS teilkondensiert zu sein und lockere „blumenähnliche“ Strukturen<sup>[459]</sup> mit Größen von ca. 100–200 nm zu bilden. Bei Zugabe von 0.3 Äq. **76** liegen neben wenigen länglichen Strängen hauptsächlich die kompakten Partikel mit ca. 30 nm Größe vor. Sowohl Ligand **77** als auch **76** können DNS schon bei einer geringer Zugabe von 0.3 Äq. zu kleinen Nanostrukturen kondensieren. Dies bestätigt zugleich den überlappenden Mechanismus aus DNS-Bindung und Kondensation, der die Auswertung der thermodynamischen Profile erschwert.

Zuletzt wurden Transfektionsexperimente mit HeLa Zelllinien durchgeführt (Abbildung 92), um die möglicherweise verbesserten zellgängigen Eigenschaften der Liganden zu überprüfen. Diese Tests zeigten nur ein marginales Transfektionsvermögen der beiden Liganden, was so nicht unbedingt zu erwarten war. Verglichen mit **62** ist die Anzahl von GCP unverändert; also keine Einflussgröße auf die Transfektionseffizienzen der Liganden **76** und **77**. Der Austausch von Phenylalanin und Tryptophan sollte sich positiv auf die zellpenetrierenden Eigenschaften der Verbindungen ausüben. Jedoch weist **76** keine signifikante Transfektion auf. Aus den ITC-Experimenten ist bekannt, dass **76** stark an DNS bindet. Eine verstärkte DNS-Bindung war auch bei **77**, durch die zusätzlichen Lysin-Einheiten, zu erwarten.

Die Transfektionseffizienz von jetPEI liegt zwar auch nur bei 20 %, doch weist einzig Ligand **76** bei einer Konzentration von 0.12 mM eine Transfektionseffizienz von gerade einmal 5 % auf. Bei einer Konzentration von 0.06 mM von Ligand **77** sind die Zellen schon vollständig aggregiert, wie es schon bei Ligand **45** beobachtet wurde (auch wenn es sich bei den Transfektionsexperimenten mit **45** um eine HEK-Zelllinie handelte). Bei 0.12 mM **77** sind nur noch wenige Zellen zu finden, die ein Fluoreszenzbild erzeugen. Eine effiziente Kondensation und starke Bindung der DNS könnte dazu führen, dass intrazellulär die DNS nicht mehr freigesetzt wird und so im Endeffekt die Transfektionseffizienz herabgesenkt wird.<sup>[556]</sup> Dies und das starke Aggregationsverhalten der Zellen in Anwesenheit der Liganden könnten Ursache für das schlechte Transfektionsverhalten der Liganden sein. Gute DNS-bindende und kondensierende Eigenschaften von Verbindungen führen somit nicht zwingend zu guten transfizierenden Eigenschaften.





**Abbildung 92.** Transfektion von HeLa Zellen mit **76** und **77**.

#### 4.3.2. Zusammenfassung DNS-Bindung und -transfektion durch multivalente Liganden

Das Konzept der Verwendung multivalenter Liganden, die mit GCP kombiniert werden, zur DNS-Bindung und deren Transport in Zellen mit dem Ziel der Gentransfektion, lieferte ermutigende Ergebnisse, aus denen sich ein erster Eindruck gewinnen lässt, welches Potential in dieser Kombination steckt. Generell deutet sich in den Experimenten an, dass neben der Seitenarmsequenz das Grundgerüst eine wichtige Rolle für das Design von synthetischen, nicht-viralen Transfektionsvektoren spielt. Symmetrische, unpolare Systeme, die z. B. eine Vorausrichtung der Arme zulassen, scheinen bevorzugt zu sein. Die Seitenkette selbst sollte, obwohl

gute DNS-Bindungseigenschaften erwünscht sind, nicht zu polar sein und neben basischen Aminosäure-Einheiten auch aromatische aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass schon geringe strukturelle Änderungen Auswirkungen auf die Bindung und Transfektion von DNS haben können. Der dreiarmlige Ligand **61** mit der Seitenkettensequenz GFK-GCP unterscheidet sich nur durch das Grundgerüst zu dem bereits bekannten Transfektionsvektor **SJ36**, weist demgegenüber aber keinerlei Transfektionseigenschaften unter den gewählten Bedingungen auf. Durch Erhöhung der Anzahl der Seitenarme auf vier, gleichbedeutend mit der Erhöhung der Multivalenz, konnte mit Ligand **62** eine Verbindung vorgestellt werden, die zwar ähnliche DNS-Bindungs- und -Kondensations-Eigenschaften aufweist wie die dreiarmligen Liganden **SJ36** und **61**, aber im Gegensatz zu **61** in der Lage ist, Zellen mit vergleichbaren Transfektionseffizienzen wie **SJ36** zu transfizieren. Der negative Einfluss auf die Transfektionseffizienz, den die Veränderung des Grundgerüsts ausübte, konnte somit durch Erhöhung der Bindungs-Multivalenz ausgeglichen werden.

Ausgehend von dem vierarmigen Liganden **62** wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die sich auf eine Modifikation der Seitenarme konzentrierte. Zunächst wurde Ligand **45** getestet, der eine inverse Aminosäuresequenz verglichen mit **62** aufweist. Durch den simplen Tausch der Reihenfolge von Phenylalanin und Lysin konnte die Verbindung zwar mit einer geringen Konzentration von 0.06 mM Zellen transfizieren (vergleichbar mit PEI), führte jedoch bei höheren Konzentration zu Schädigungen der Zellen.

Analoga mit einer verminderten Multivalenz wurden ebenfalls getestet. Dabei zeigte die zweiarmlige Verbindung **58** zwar nur eine Transfektionseffizienz von 16 %, d. h. ca. der Hälfte der Effizienz von PEI, dies sind bezogen auf Masse und Ladung allerdings die höchsten Werte, die ca. 10-fach bzw. 90-fach über denen von PEI liegen. Die Verbindung weist nur zwei permanente positive Ladungen an den Lysin-Gruppen auf, die GCP-Einheiten liegen teilprotoniert vor. Verbindung **58** ist somit der Prototyp einer neuen kleinen Verbindungsklasse, deren Eigenschaften sich mit der von *Mao Li* erforschten GCP-modifizierten Tetralysin-Liganden<sup>[463]</sup> vergleichen lassen kann.

Desweiteren konnte durch die Untersuchung von Ligand **72**, das Argininanalogon von **45**, gezeigt werden, dass GCP essentiell für das Transfektionsvermögen dieser vierarmigen Liganden ist, denn **72** wies bei allen getesteten Konzentrationen keinerlei transfizierende Eigenschaften auf.

Durch den Austausch von Phenylalanin gegen Tryptophan und Einfügen eines weiteren Lysin-Restes in die Seitenkettensequenz, konnten polarere Liganden erhalten werden, die zusätzliche Wasserstoffbrücken sowie ionische Wechselwirkungen ausbilden können. Dies sollte die DNS-Bindungseigenschaften wie auch die Zellaufnahme verbessern. Erste Transfektionsstudien zeigten jedoch kaum Transfektionsvermögen dieser Liganden. Hierdurch wird einmal mehr deutlich, wie wichtig die Wahl der Seitenarm-Sequenz für das Vektordesign ist.

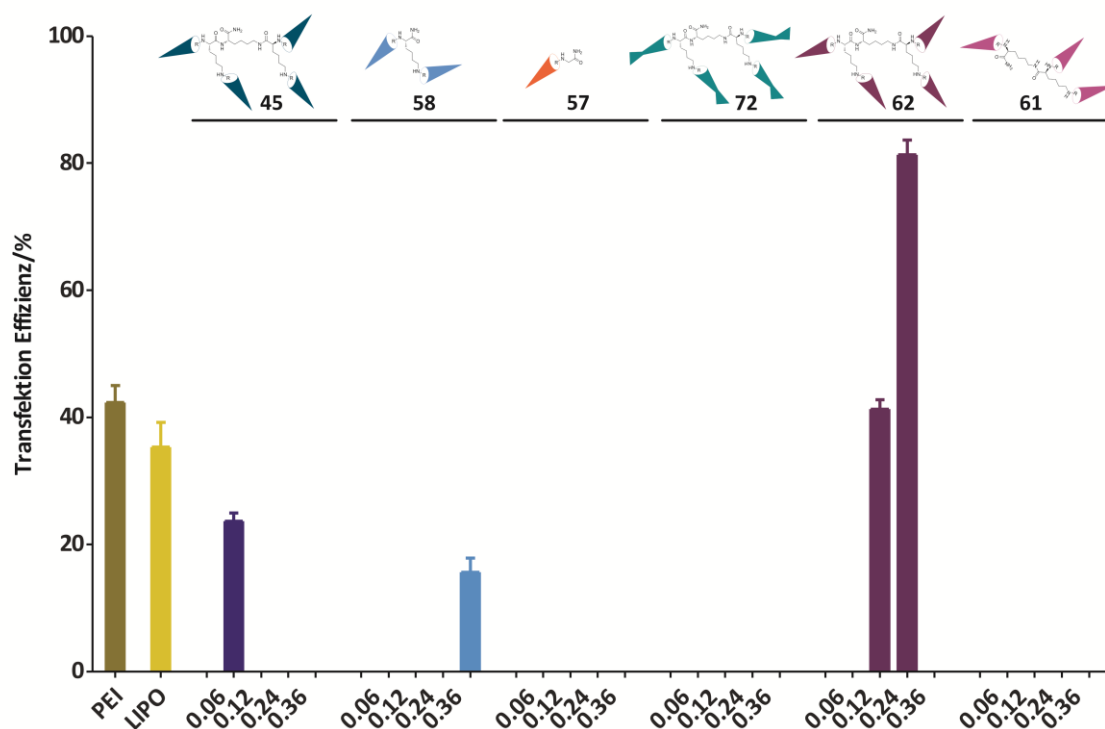


Abbildung 93. Übersicht der Transfektionseffizienzen der multivalenten Liganden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass obwohl in vorhergehenden DNS-Bindungsstudien mittels EB oder DLS die Verbindungen vergleichbare Eigenschaften aufzeigen, die Transfektionsexperimente deutliche Unterschiede aufweisen, sodass der Schluss nicht zugelassen werden kann, von den Bindungseigenschaften auf das Transfektionsvermögen zu schließen. Die Transfektion setzt eine Reihe von Mechanismen voraus (DNS-Bindung und -Kondensation, Überwindung der Zellmembran oder endosomale Aufnahme, endosomales Entkommen, Freisetzung der DNS und Aufnahme in den Zellkern) und es gilt, eine Balance in der Struktur zu finden, die diese Eigenschaften ausgewogen vereint. Wodurch genau letztlich die Liganden scheitern, kann nur durch weiterführende Studien geklärt werden. So könnte über Co-Transfektion mit Chloroquin das endosomale Entkommen überprüft werden. Durch Anwendung auf verschiedene Zelllinien und gezielten Bindungsstudien mit Membranbestandteilen könnte erforscht werden, ob die Liganden selektiv Zelltypen erkennen können, durch Anfärben der Zellkompartimente und der Liganden könnte überprüft werden, wo genau sich die Liganden in der Zelle befinden. Zudem ist nicht geklärt, wo die Liganden an die DNS (kleine oder große Furche, interkalierend) binden oder ob sie selektiv für eine DNS-Art (z. B. AT-reich oder GC-reich) bzw. für bestimmte Nukleotide sind. Es bleiben somit noch viele Fragen offen und die Forschung auf dem Gebiet spannend. Die hier vorgestellten multivalenten Liganden stellen eine weitere Verbindungsklasse nicht-viraler Genfähren dar, von denen zu hoffen ist, dass das ehrgeizige Ziel der Gentransfektion weiterhin beforscht werden kann.

## 5. Zusammenfassung

---

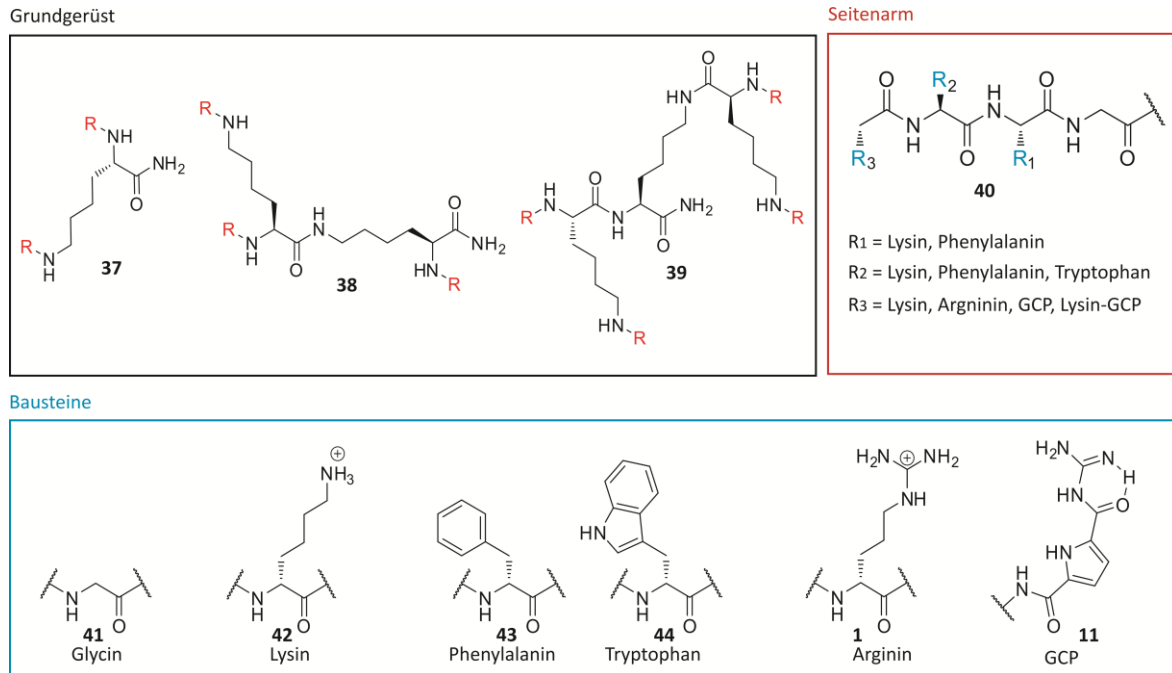
Im Fokus der vorliegenden Promotionsarbeit standen die Entwicklung und Untersuchung multivalenter Liganden als Stabilisatoren von Protein-Protein-Interaktionen und als künstliche Gentransfektionsvektoren. Über molekulare Erkennungsprozesse sollten die biologischen Zielstrukturen supramolekular adressiert werden. Durch die Kombination der multivalenten Liganden mit dem künstlichen Anionen-Erkennungsmotiv GCP sollte dieser Erkennungsprozess maßgeblich unterstützt werden.

Dementsprechend gliederte sich die Arbeit in drei Teile:

1. Entwicklung und Synthese von multivalenten Liganden, die das künstliche Anionen-Bindungsmotiv GCP tragen
2. Untersuchung der synthetischen Liganden als Stabilisatoren der 14-3-3 $\zeta$ /C-RAF- sowie der 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung
3. Untersuchung der synthetischen Liganden auf ihre Fähigkeit DNS zu binden, zu kondensieren und Zellen zu transfizieren

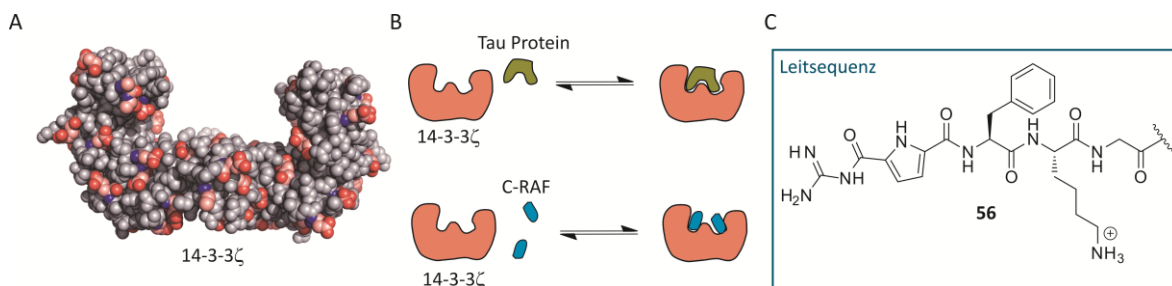
Die Liganden sind dendritisch aufgebaute, polykationische Peptide. Als Grundgerüst wurden Lysine miteinander verknüpft, um zwei-, drei- oder vier-armige Verbindungen zu generieren. Als Seitenarme wurden verschiedene Peptidsequenzen bestehend aus Lysin, Tryptophan, Phenylalanin und Arginin, die über Glycin mit dem Grundgerüst verbunden wurden, verwendet. Basierend auf den Forschungsarbeiten von *Wich* und *Kuchelmeister* (*vide supra*) wurde für die Sequenz der Seitenarme eine Kombination aus kationischen und hydrophoben Aminosäuren gewählt.<sup>[32,465]</sup> Die kationischen Aminosäuren Lysin und Arginin können über ihre Seitenketten mit den Carboxylatresten von Glutamin- bzw. Asparaginsäure oder der Phosphatgruppe ionisch wechselwirken und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Hydrophobe- oder  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen werden durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin oder Tryptophan vermittelt. Das Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP) sollte zusätzlich als künstliches Anionen-

Bindungsmotiv verwendet werden. Durch die Synthese nach dem Baukastenprinzip (siehe hierzu auch Abbildung 94) waren die Liganden leicht zugänglich und die Abfolge der Aminosäuren in den Seitenarmen leicht variierbar. Auf diese Weise wurden insgesamt elf Liganden synthetisiert und konnten auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden. Kernfragen waren dabei, welchen Einfluss die Bindigkeit der Liganden nimmt und inwiefern GCP gewinnbringend in den Erkennungsprozess einbezogen werden kann.



**Abbildung 94.** Aufbau der multivalenten Liganden.

Für die Untersuchung der multivalenten Liganden als Modulatoren von Protein-Protein-Interaktionen wurde als Ziel die Wechselwirkungen zwischen dem leicht aziden 14-3-3ζ-Protein mit C-RAF und dem Tau Protein gewählt. Sowohl von C-RAF als auch Tau Protein wurden Peptidfragmente verwendet. Als Leitsequenz für die multivalenten Liganden wurde eine Abfolge aus Glycin, Lysin, Phenylalanin und GCP festgelegt.



**Abbildung 95.** A): 14-3-3ζ-Protein; hervorgehoben sind die Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure auf der Proteinoberfläche. B) Wechselwirkung von 14-3-3ζ mit Tau Protein (oben) und 14-3-3ζ mit C-RAF (unten). C) Leitsequenz der PPI-Stabilisatoren: Glycin-Lysin-Phenylalanin-GCP.

Mittels Fluoreszenzpolarisations-Experimenten wurde zunächst eine Serie aus einem ein- bis vier-armigen Liganden, die alle die oben genannte Leitsequenz gemein haben, auf ihr Vermögen

hin untersucht, die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF zu beeinflussen. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Bindungskonstanten der Komplexbildung des 14-3-3 $\zeta$ -Proteins mit C-RAF bestimmt. Durch Wiederholung des gleichen Experiments in Anwesenheit eines der jeweiligen Liganden konnte ermittelt werden, dass alle vier Liganden die Wechselwirkung tatsächlich stabilisieren können. Dies deutet auf eine Interaktion der Liganden sowohl mit 14-3-3 $\zeta$  als auch C-RAF hin. Es konnte somit erfolgreich eine neue Molekülklasse als Stabilisatoren für PPI entwickelt werden.

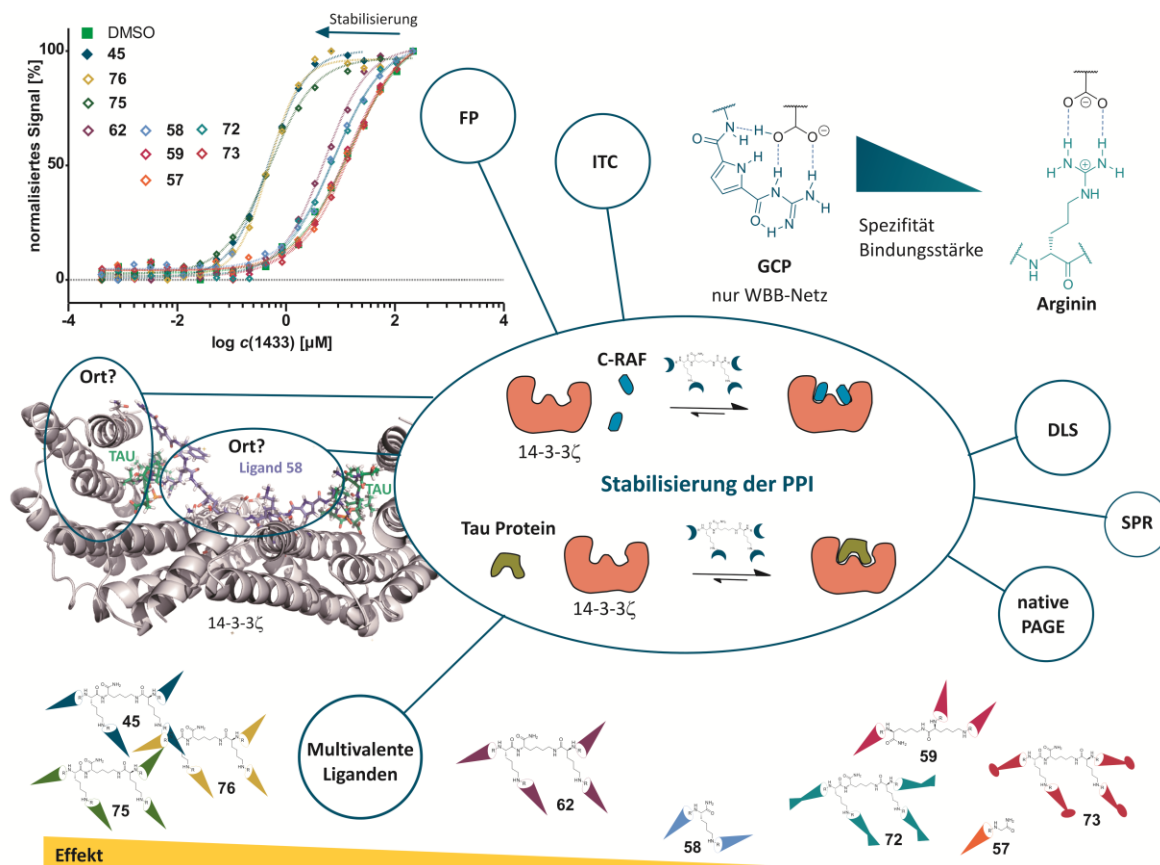
Das zweite Ergebnis dieses Experiments war, dass der vierarmige Ligand **45** dieser Serie mit einem Faktor von 20 signifikant das größte Vermögen aufwies die Wechselwirkung zu stabilisieren. Im Vergleich zu der in der Literatur aufgeführten Verbindung Cotylenin-A<sup>[307]</sup> weist **45** sogar eine ca. 5-fach höhere Affinität für den Komplex aus 14-3-3 $\zeta$  und C-RAF (für beide Untersuchungen wurde das gleiche Peptidfragment verwendet) auf. Die anderen drei Liganden der Serien stabilisieren den Komplex kaum (Faktor 1.4-1.7). Der Unterschied im Stabilisierungsverhalten der Liganden, die sich über das Grundgerüst voneinander unterscheiden und somit über eine verschiedene Armigkeit verfügen, ist auf den multivalenten Effekt zurückzuführen. Eine Veränderung der Anzahl der Arme nimmt also tatsächlich signifikant Einfluss auf den Stabilisierungsprozess. Die hier vorgestellte Studie beschreibt somit als eine der ersten Untersuchungsarbeiten den Einfluss des multivalenten Effekts auf die Stabilisierung einer PPI. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dies nicht nur für die 14-3-3 $\zeta$ /C-RAF-Wechselwirkung sondern auch für die 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein-Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte. Das Tau Peptidfragment bindet im Gegensatz zu dem C-RAF-Peptidfragment über zwei Bindungsstellen an das 14-3-3 $\zeta$ -Protein und ist ca. dreifach so groß wie das C-RAF-Peptidfragment. Mit Hilfe weiterer Methoden, wie ITC, DLS und nativer PAGE, wurde die Komplexbildung der drei Komponenten Ligand **45**, 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein zusätzlich nachgewiesen. Erste QM-Rechnungen mit dem zweiarmligen Liganden **58** konnten zwei mögliche Bindungsorte (am Rand der 14-3-3 $\zeta$ -Bindungsfurche und innerhalb der durch das 14-3-3 $\zeta$ -Dimer geformten, an ein W erinnernden Cavität) des Liganden identifizieren.

Der Einfluss des künstlichen Anionen-Bindungsmotiv GCP auf die Stabilisierung wurde in FP-Experimenten untersucht, indem je ein entsprechendes vierarmiges Arginin- und Lysin-Derivat mit Ligand **45** verglichen wurde. Dabei stellte sich in der Tat heraus, dass von den drei analogen Verbindungen nur diejenige die Komplexbildung des 14-3-3 $\zeta$ -Proteins sowohl mit C-RAF als auch Tau Protein stabilisieren kann, welches GCP trägt. Die Liganden **72** (Arginin-Derivat) und **73** (Lysin-Derivat) können, obwohl sie den gleichen vierarmigen Aufbau wie **45** aufweisen und sich nur im terminalen Rest unterscheiden, die 14-3-3 $\zeta$ -Wechselwirkungen nicht beeinflussen. Der Effekt kann nur auf das definierte Wasserstoffbrückennetzwerk zurückzuführen sein, das GCP im Gegensatz zu der Guanidinogruppe des Arginins und der Amino-Funktion des Lysins aufbauen kann und dadurch eine erhöhte Spezifität und Bindungsstärke für Oxo-Anionen aufweist. Erstmals konnte so der Einfluss eines künstlichen Bindungsmotivs für die Stabilisierung einer PPI nachgewiesen werden.



Dieses Ergebnis verdeutlicht das Potential der GCP-Gruppe als Baustein rational entworfener Liganden im besonderen Maße.

Nach diesen positiven Ergebnissen wurde eine Struktur-Wirkungs-Analyse weiterer vierarmiger Liganden durchgeführt. Diese zeigte, dass zudem der Aufbau der Seitenarmsequenz für die stabilisierende Wirkung der vierarmigen Liganden bedeutsam ist. Durch Einbau der hydrophoben Aminosäure Tryptophan (welches zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann) anstelle von Phenylalanin, kann der Einfluss der GCP-Gruppe verringert werden.



**Abbildung 96.** Zusammenfassung der Stabilisierung von 14-3-3ζ-Wechselwirkungen mit multivalenten Liganden.

Zukünftig sollte der Bindungsort und die Ziel-Selektivität bei der Entwicklung der Liganden mitberücksichtigt werden, da so Zielstrukturen noch gerichteter adressiert werden können. Für die Suche nach neuen Leitstrukturen, könnte zudem eine kombinatorische Bibliothek erstellt werden, die eine Variation sowohl der Seitenarmesequenz als auch des Grundgerüsts zulässt. Da das Augenmerk des Ligandendesigns bisher nicht auf der Struktur oder den Eigenschaften (z. B. Flexibilität) des Grundgerüsts lag, könnte hier ein entscheidender Einflussfaktor liegen.

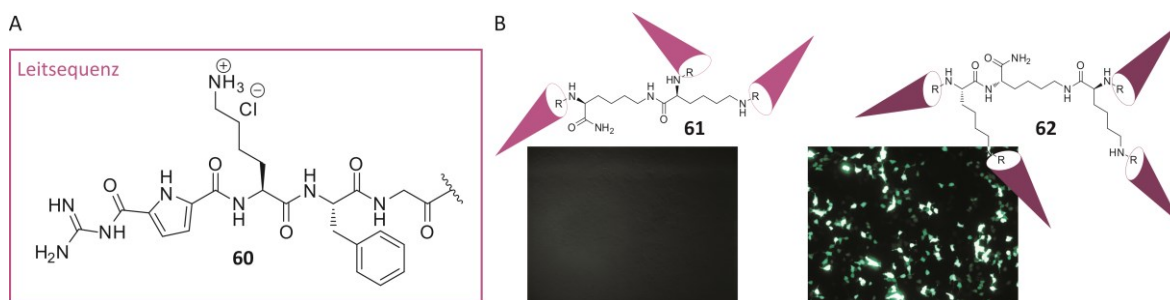
Insgesamt konnte erstmals durch Kombination von Multivalenz mit einer künstlichen Erkennungseinheit eine neue Klasse von Liganden vorgestellt werden, die die Interaktion zweier Proteine (14-3-3ζ/C-RAF und 14-3-3ζ/Tau Protein) stabilisiert. Es konnte nachgewiesen werden,



dass auf die Stabilisierung sowohl die Multivalenz der Liganden als auch das auf Anionen-Erkennung angepasste GCP-Bindungsmotiv einen maßgeblichen und gewinnbringenden Einfluss nehmen.

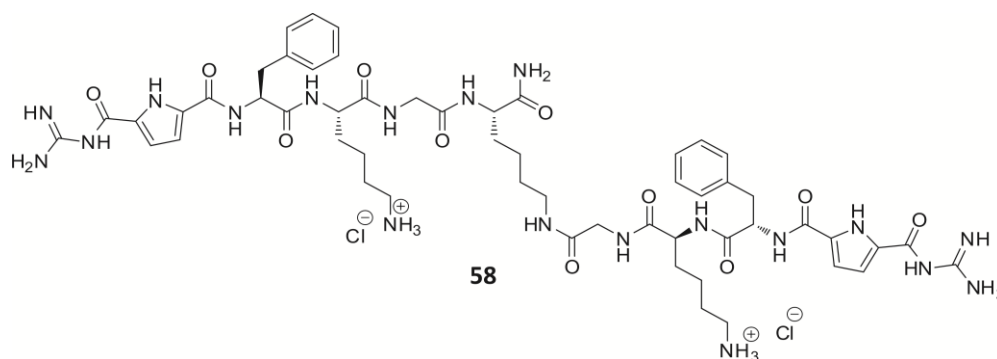
Die Untersuchungen der synthetischen Liganden im letzten Teil dieser Arbeit bezogen sich auf die Bindung von DNS und den Transport von genetischem Material ins Zellinnere. Für das Design eines neuen Vektorsystems wurde als Startsequenz die Abfolge aus Phenylalanin, Lysin und GCP gewählt (siehe Abbildung 97A), die sich direkt von einem bestehenden dreiarmligen Vektor von *Kuchelmeister* ableitet.<sup>[465]</sup> Durch die Verwendung des dendritischen Grundgerüsts fügt sich diese Ligandenklasse in die vorausgehenden Forschungen nahtlos ein und ermöglicht zudem die Weiterentwicklung zu vierarmigen Systemen.

Bei den Transfektionsstudien stellte sich überraschenderweise heraus, dass der dreiarmlige Ligand **61** Zellen nicht transfizieren kann. Dies wurde so nicht erwartet, da ähnliche dreiarmlige Systeme dazu in der Lage waren. Erst durch Erhöhung der Bindungs-Multivalenz konnte eine deutliche Transfektion der Zellen nachgewiesen werden (da als Fracht GFP-kodierende Plasmide transportiert wurden, fluoreszieren die Zellen nach erfolgreicher Transfektion leuchtend grün, wie auch in Abbildung 97B zu sehen ist). Da beide Substanzen in DNS-Bindungsstudien (z. B. EB-Verdrängungsassay) ähnliche Eigenschaften aufwiesen, deutet dies darauf hin, dass sich von den Ergebnissen der DNS-Bindungsstudien nicht auf das Transfektionsvermögen der Liganden schließen lässt. Gleichzeitig rückt der Einfluss der Eigenschaften des Grundgerüsts, wie Flexibilität oder der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, in den Vordergrund, der bei der Entwicklung von neuen Liganden nicht außer Acht gelassen werden sollte.



**Abbildung 97.** A) Leitsequenz der Transfektionsvektoren. B) Der dreiarmlige Transfektionsvektor **61** kann im Gegensatz zu dem vierarmigen Vektor **62** das Plasmid für das grün fluoreszierende Protein nicht in Zellen transfizieren.

Werden in der Abfolge der Seitenarmsequenz Phenylalanin und Lysin vertauscht, erhält man die multivalenten Liganden, die schon erfolgreich als PPI-Stabilisatoren eingesetzt wurden. Durch die Untersuchung der Ligandenserie in Transfektionsexperimenten konnte einer der bislang kleinsten Transfektionsvektoren (**58**) untersucht und identifiziert werden. Dieser weist zwar nur etwa die Hälfte der Transfektionseffizienz des Goldstandards PEI auf, bezogen auf Masse und Ladung jedoch ist dieser Ligand PEI weit überlegen.

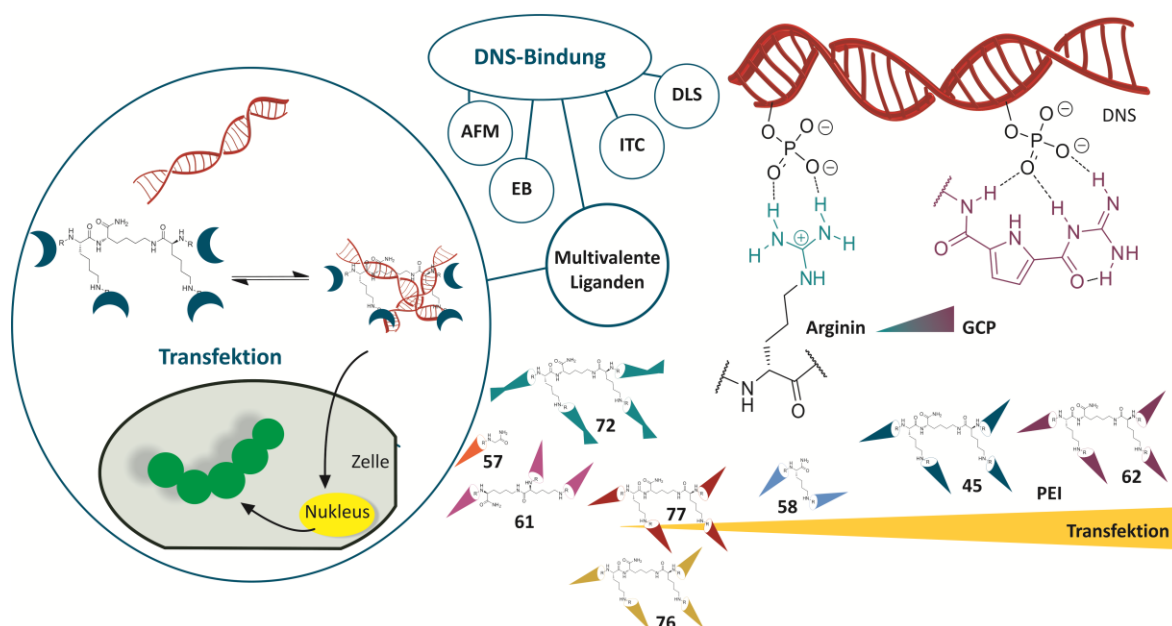


**Abbildung 98.** Struktur des Transfektionsvektors **58**.

Der Einfluss des künstlichen GCP-Bindungsmotivs auf die Transfektionseffizienz konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Hierfür wurden zwei vierarmige Verbindungen untersucht, die sich in der letzten Position der Seitenarmsequenz unterscheiden (und zwar trägt die eine Verbindung GCP, die andere Arginin), ansonsten aber analog aufgebaut sind. Die Transfektionsexperimente zeigen eindrucksvoll, dass nur die GCP-tragende Verbindung Zellen transfizieren kann. Somit kann ein Ligand durch den Einbau einer künstlichen Erkennungseinheit maßgeblich verbessert werden. Die Verwendung des GCP-Bindungsmotivs stellt daher ein gewinnbringendes Werkzeug für Weiterentwicklung von Transfektionsvektoren dar.

Eine weitere Optimierung der Liganden für den Genstransfektionsprozess, sollte durch Einbau von Tryptophan anstelle von Phenylalanin erfolgen, da das Einfügen von Tryptophaneinheiten die zellpenetrierenden Eigenschaften von Liganden verbessern kann. Dies konnte für die hier verwendeten dendritischen Liganden nicht bestätigt werden. Ebenso wenig konnte eine Erhöhung der positiven Ladung, was ebenfalls ein bekanntes Werkzeug zur Verbesserung von Liganden ist, die Transfektionseffizienz erhöhen. Ungeklärt bleibt, an welcher Stelle der Transfektionsprozess scheitert. Dazu sind weitere Studien, wie z. B. Lokalisationsexperimente, nötig. Jedoch konnte in vorhergehenden DNS-Bindungsstudien festgestellt werden, dass die Liganden DNS vergleichsweise stark binden. Daher könnte die DNS-Freisetzung in der Zelle der limitierende Faktor in dem Transfektionsprozess sein.

An dieser Stelle wird ein weiteres Mal hervorgehoben wie empfindlich die Gentransfektion auf strukturelle Änderungen der künstlichen Genfähren reagiert und wie wichtig die Suche nach neuen Systemen ist. Eine Struktur-Wirkungs-Analyse ist nach wie vor eine unumgängliche Grundlage für die Entwicklung nicht-viraler Vektoren. Die Zellselektivität kann hier ebenfalls als Schlüsselkonzept mit einbezogen werden, da das gerichtete Einschleusen von genetischen Material in definiertes Zielgewebe eine der Herausforderungen der Gentherapie darstellt.



**Abbildung 99.** Verwendung der multivalenten Liganden als Transfektionsvektoren.

Mit den hier vorgestellten multivalenten Liganden konnte eine neue Verbindungsklasse nicht-viraler Genfähren identifiziert werden. Die Untersuchungsergebnisse stützen die Resultate vorangegangener Studien und zeigen, dass das Konzept der Kombination aus Multivalenz mit künstlichen Bindungsmotiven auf neue Verbindungsklassen übertragbar ist.

Anhand der Arbeiten wurde das große Potential rational entworfener, multivalenter Liganden, die die künstliche Anionen-Erkennungseinheit GCP tragen, eindrucksvoll aufgezeigt. Die synthetischen Liganden verfügen über die Bindung von einfachen Aminosäure und der Erkennung von Proteinoberflächen hinaus, die Fähigkeit, komplexe Protein-Protein-Wechselwirkungen zu beeinflussen. So konnten Verbindungen als einige der wenigen bisher bekannten PPI-Stabilisatoren identifiziert werden. Des Weiteren konnten, anknüpfend an vorhergehende Forschungen zur Bindung einfacher Nukleotide und DNS bis hin zu dem komplexen Prozess der Gentransfektion, diese synthetischen Liganden erfolgreich als Genfähren eingesetzt werden. Eine Erhöhung der Bindungsmultivalenz in Kombination mit dem Einbau des GCP-Bausteins in den Liganden sorgte sowohl für eine verbesserte Stabilisierung der PPI als auch für eine erhöhte Transfektionseffizienz der entwickelten Vektoren. Die Ergebnisse und die gewonnen Erkenntnisse der hier durchgeführten Untersuchungen sollen zukünftig bei der Entwicklung künstlicher Ligandensysteme weiterhelfen und als Grundlage für die weitere Erforschung von PPI-Stabilisatoren sowie Transfektionsvektoren dienen. Denn es bleiben viele Fragen offen, Hürden unüberwunden und wichtige Aspekte außer Acht gelassen; doch wie *Liebig* schon schrieb „*die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört*“.

## 6. Summary

---

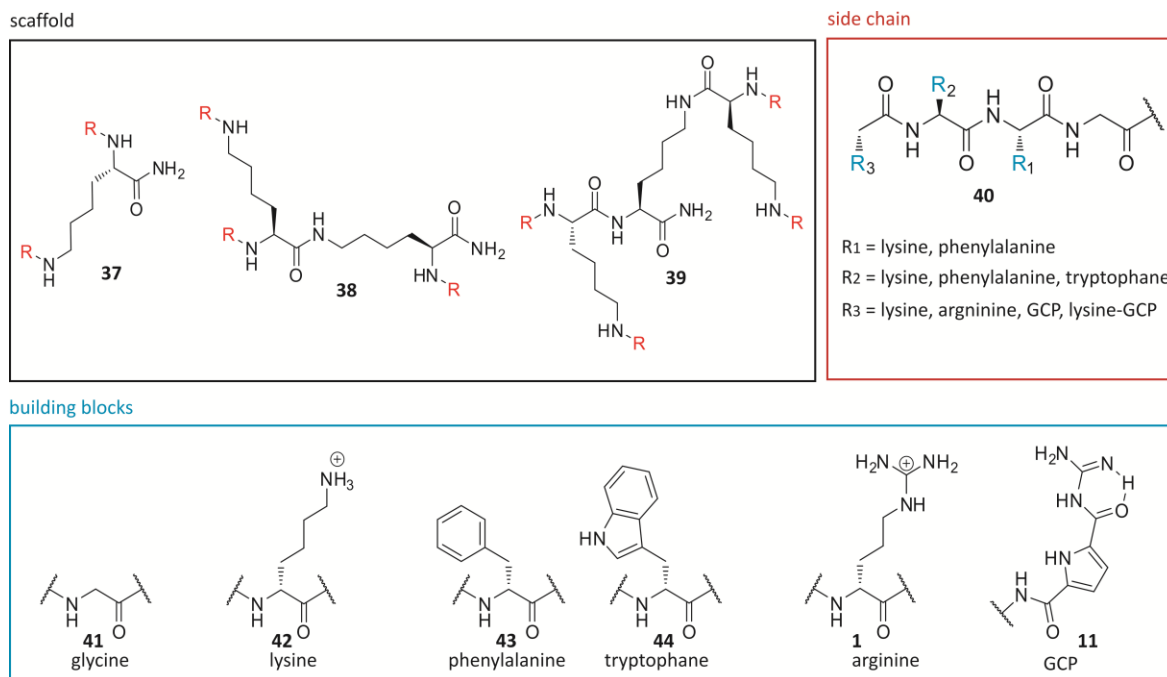
The research focus of this thesis was centered on the development and investigation of multivalent ligands as stabilizers of protein protein interactions and as artificial gene transfection vectors. Biological targets should be addressed supramolecular due to molecular recognition processes. A combination of multivalent ligands with the artificial anion recognition unit GCP should enhance the recognition process significantly.

Following this objective, the thesis is divided into three parts:

1. Developement and synthesis of multivalent ligands with the artificial anion binding motif GCP
2. Investigation of the synthetic ligands as stabilizers of 14-3-3 $\zeta$ /C-RAF and 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein interactions
3. Investigation ability of the synthetic ligands to bind and condensate DNA as well as transfect cells

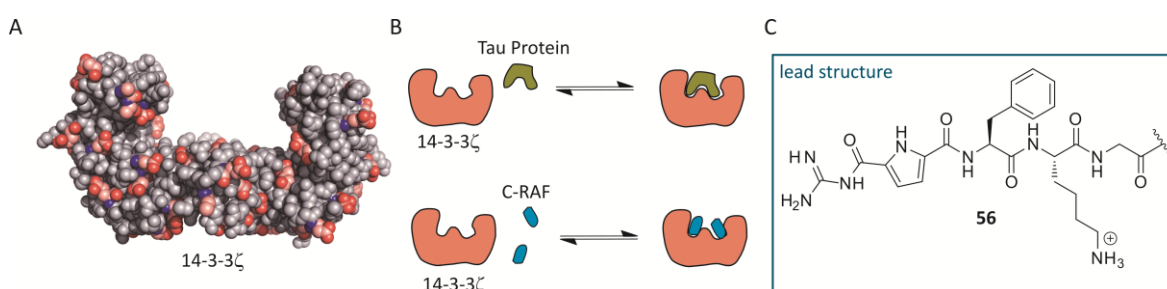
These ligands are polycationic peptides built dendritically. As a scaffold several lysines were linked to obtain two-, three- or four-armed compounds. As sidechains different peptide sequences were used containing lysine, tryptophane, phenylalanine and arginine, which were connected to the scaffold via glycine as a linker. Based on the previous research of *Wich* and *Kuchelmeister* (*vide supra*) a combination of cationic and hydrophobic amino acids were chosen for the side chain sequence.<sup>[32,465]</sup> Cationic amino acids as lysine and arginine can form ionic interactions and hydrogen bonds by the interaction of their side chains with carboxylate residues of glutamic and aspartic acid or phosphates. Hydrophobic and  $\pi$ - $\pi$ -interactions were mediated by aromatic amino acids as phenylalanine or tryptophane. Additionally guanidiniocarbonylpyrrole (GCP) was used as an artificial anion binding motif. The modular concept of the synthesis (see figure 100) enabled an easy access to the ligands and variability of the order of amino acids within the side chains. Thus, in total eleven ligands were synthesized and their applicability could be investigated. Key questions

here were for once, which effect the ligand's valence has and if the GCP can be involved advantageously into recognition processes.



**Figure 100.** Modular concept of multivalent ligands.

For the investigation of multivalent ligands as modulators of protein protein interactions the interaction between lightly acidic 14-3-3 $\zeta$  protein and C-RAF or Tau Protein were chosen. For both C-RAF and Tau Protein peptide fragments were used. As lead structure for the ligand design a sequence of glycine, lysine, phenylalanine and GCP was defined.



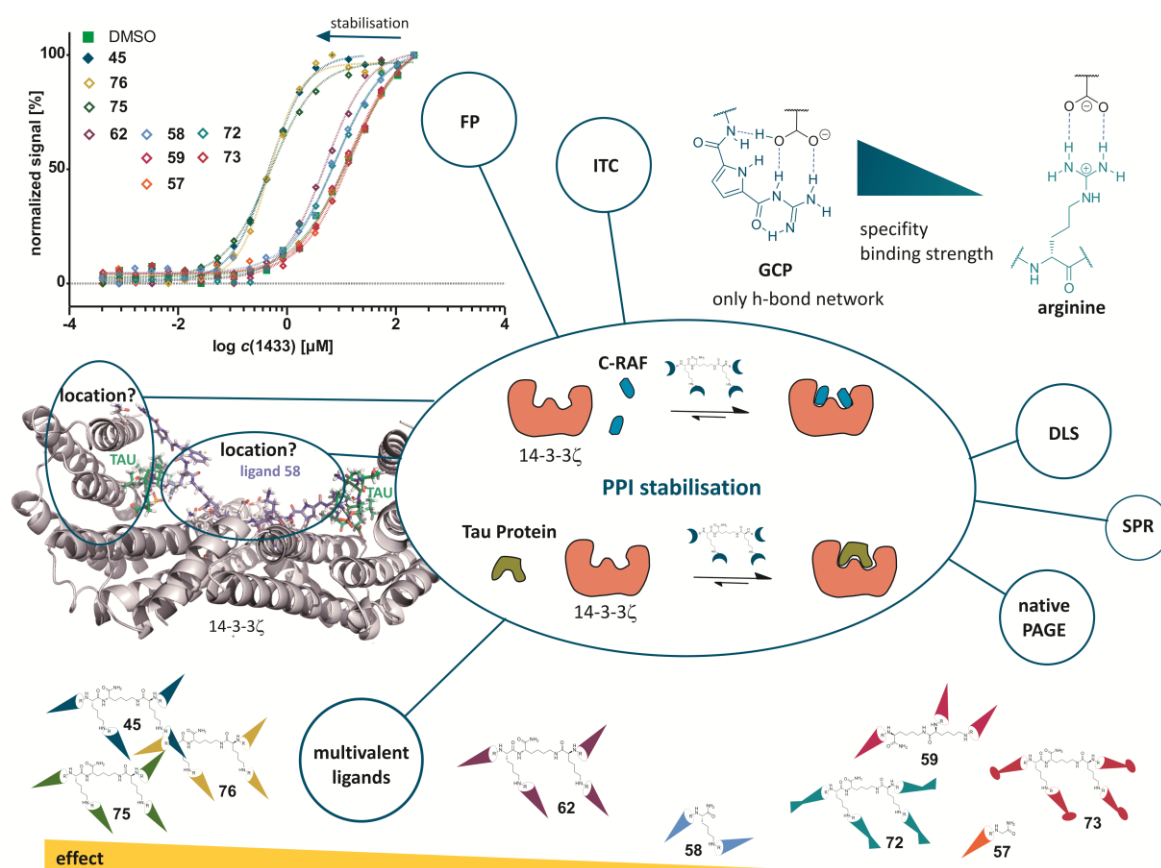
**Figure 101.** A): 14-3-3 $\zeta$  protein; highlighted are amino acids glutamic and aspartic acid on the protein's surface. B) Interaction of 14-3-3 $\zeta$  and Tau Protein (top) as well as 14-3-3 $\zeta$  and C-RAF (bottom). C) lead structure of ppi stabilizers: glycine-lysine-phenylalanine-GCP.

By the use of fluorescence polarisation experiments initially a series of one- to four-armed ligand, all containing lead structure **56**, were tested to influence the interaction between 14-3-3 $\zeta$  and C-RAF. At the first step the binding constant of the complexation of 14-3-3 $\zeta$  protein and C-RAF was determined. The fact that all ligands are able to stabilize the interaction was confirmed by repetition of the experiments in presence of one particular ligand. Here an interaction of the ligands both with 14-3-3 $\zeta$  and C-RAF was indicated. Successfully, a new class of molecules acting as stabilizers of a PPI was developed.

The second outcome of this experiment was the fact, that ligand **45** showed the highest stabilization effect by a factor 20 compared to the other tested ligands. Compared to literature known compound Cotylenin A,<sup>[307]</sup> **45** shows a 5-fold higher affinity for the complex of 14-3-3 $\zeta$  and C-RAF (for both investigations the same peptide fragments were used). The other three ligands of the series stabilized the complex just barely (factors 1.4-1.7). The difference in the stabilisation behaviour of the ligands, which differ in scaffold and therefore vary in valency, can be ascribed to multivalency effects. A variation of the amount of the side arms indeed influenced the stabilisation process significantly. In this work, one of the first research studies of the multivalency effect influencing PPI stabilisation processes was described. Further examinations show that this is also true for 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein interaction. In contrast to C-RAF peptide fragment, tau peptide fragment binds via two binding sites to 14-3-3 $\zeta$  protein and is approximately three times bigger than C-RAF. By the use of other methods such as ITC, DLS or native PAGE, the complexation of the three compounds ligand **45**, 14-3-3 $\zeta$  and Tau Protein was proven as well. First QM calculations with two-arm ligand **58** identified two possible binding locations (at the rim of 14-3-3 $\zeta$  binding groove and within the W-shaped cavity built by the 14-3-3 $\zeta$  dimer).

The influence of the artificial anion binding motif GCP on the stabilisation process was examined in FP experiments using four-arm arginine- and lysine derivatives which were comparable to ligand **45**. In this respect, for the three analogous compounds it was established that only the ligand containing GCP is able to stabilize both 14-3-3 $\zeta$ /C-RAF and 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein interaction. Ligands **72** (arginine derivative) and **73** (lysine derivative) cannot influence the 14-3-3 $\zeta$  interactions, although they have the same four-armed structure as **45** differing only in the terminal residues. This is due to the fact that the special design of GCP can build a well-defined H-bond network in contrast to guanidine function of arginine and amino function of lysine. Thus, GCP shows an increased specificity and binding strength for oxo-anions. For the first time, the influence of an artificial binding motif on PPI stabilisation could be proven. This result demonstrates the outstanding potential of the GCP moiety used as building block for rationally designed ligands.

Following these positive results a structure-activity-relationship analysis was performed using other four-armed ligands. The examinations showed the importance of the chosen side arm sequence for the stabilisation effect. Using hydrophobic amino acid tryptophane (which forms additionally H-bonds) instead of phenylalanine, the influence of GCP is reduced.



**Abbildung 102.** Summary of 14-3-3 $\zeta$  interactions stabilisation by multivalent ligands.

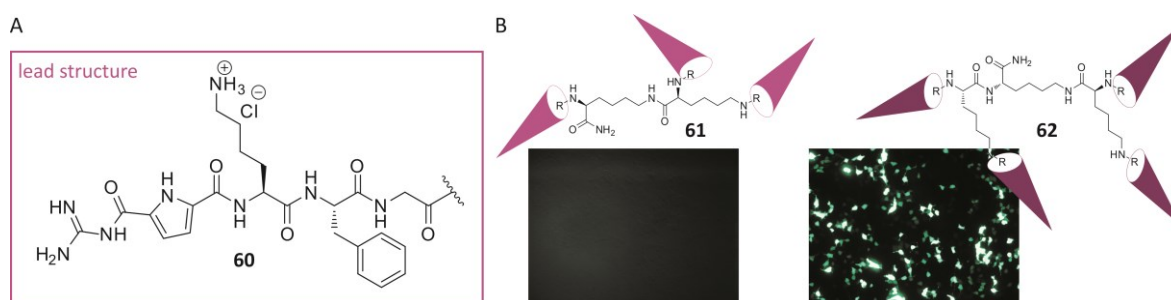
Prospectively, binding location and target selectivity should be taken into account for ligand design. As a consequence target molecules could be addressed in a more specific manner. To find new lead structures combinatorial libraries could be developed allowing variation of side chain (sequences) and scaffolds at the same time. Ligand design was not yet focused on structure or properties (e. g. flexibility) of the scaffold, so this could be an additional important factor influencing the ligand's effectivity.

For the first time, however, a new class of ligands were introduced combining multivalency with an artificial recognition unit to stabilize the interaction of two proteins (14-3-3 $\zeta$ /C-RAF and 14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein). It was proven that the stabilisation effect was influenced essentially and advantageously by both multivalency of the ligands and especially the artificial and well designed anion binding motif GCP.

In the last part of this thesis, the examinations of the synthetic ligands involved DNA binding properties and the ability to transport genetic material into cells. As a lead structure for the design of a new vector system, a sequence of phenylalanine, lysine and GCP was chosen (see figure 103A), which is directly derived from *Kuchelmeister's* three-armed vector.<sup>[465]</sup> By the use of the dendritic scaffold, this new class of ligands dovetail with previous research and enables additionally the development of four-armed systems.

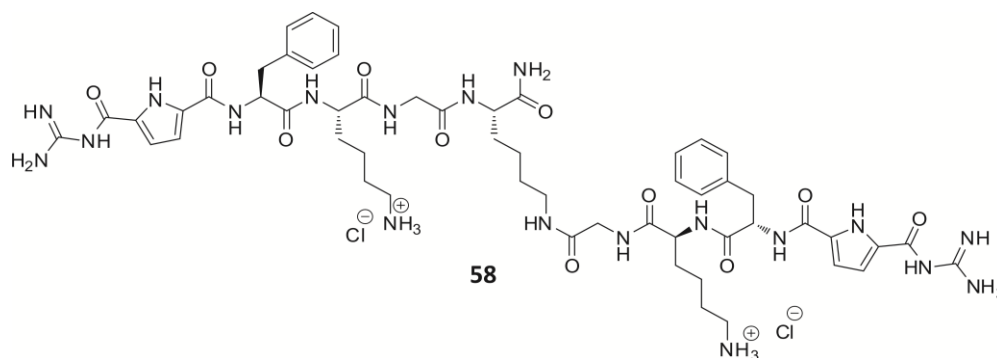


Surprisingly, the transfection studies showed that a three-arm ligand (**61**) was not able to transfect cells. This was not expected since similar vectors with the same side chain sequence were able to transfect cells successfully. A distinct transfection could only be verified by increasing the binding valency (because GFP-encoding plasmid was transported as cargo, after successful transfection the cells fluoresce bright green, as it is shown in figure 103B). Both **61** and **62** showed similar properties in DNA binding studies (e. g. EB displacement assay), indicating that from the results of DNA binding studies the transfection ability of a ligand cannot deduced. At the same time the influence of the scaffold properties, as flexibility or ability to form H-bonds, is foregrounded, which should not be neglected during ligand design.



**Figure 103.** A) Lead structure of transfection vectors. B) In contrast to four-armed vector **62**, the three-armed transfection vector **61** cannot transfect cells by delivering the plasmide encoding green fluorescent protein.

Changing phenylalanine with lysine within the side chain sequence the multivalent ligands were obtained which were successfully used in PPI stabilisation processes. Examination of the ligand series within transfection experiments, one of the smallest vectors (**58**) so far could be identified. Ligand **58** showed approximately half of transfection efficiency of gold standard PEI, but in terms of mass and charge **58** is superior to PEI.

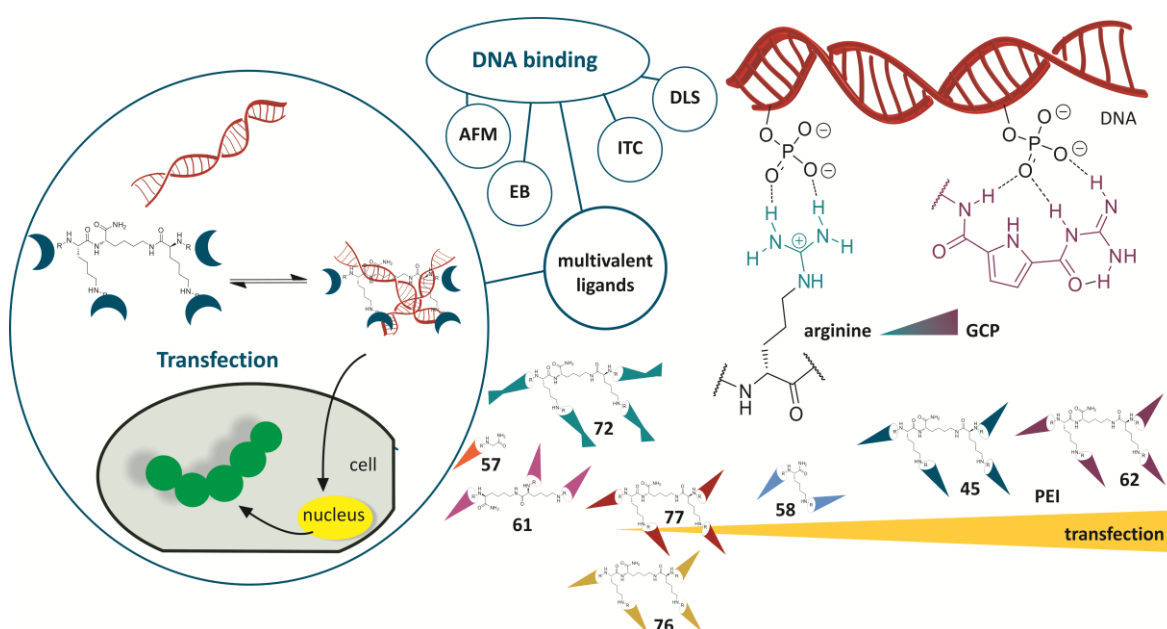


**Figure 104.** Struktur of transfection vector **58**.

Likewise the influence of artificial binding motif GCP on transfection efficiency was verified. Therefor two compounds differing in termial residues of side chain sequence were examined (one compounds is linked to GCP, the other to arginine). Transfection experiments showed impressively only GCP-containing ligand to transfect cells. Thus, ligands could be improved essentially by the integration of artificial recognition units. The use of binding motif GCP is a powerfull tool for the development of transfection vectors.

Another ligand optimisation for gene transfection processes should be realized by the use of tryptophane instead of phenylalanine due to improved cell penetrating properties of vectors containing tryptophane. However, this has not been confirmed for the dendritic ligands. Nor could the increase of positive charges, which is also a well-known tool for vector improvement, enhance transfection efficiency. At which point of the transfection the process failed, remained unclear. Though previous DNA binding studies revealed relatively strong binding between ligands and DNA. Thus DNA-dissociation within the cell could be limiting the transfection process.

Here, once again the sensitivity of gene transfection on structural variations of artificial gene delivery systems is pointed out. Hence the search for new vector systems remains important. A structure-activity-relationship analysis is still a necessary basis for the development of non-viral vectors. Additionally cell selectivity can be included as a key concept, because targeted transfection of genetic material in defined target tissues is still challenging gene therapy.



**Figure 105.** Use of multivalent ligands as transfection vectors.

With the examination of the multivalent ligand a new class of non-viral gene delivery system was identified. The research within this thesis supports results of previous studies and shows that the concept of combining multivalency with artificial binding units is transferable to new structures.

On the basis of these results demonstrate impressively the great capability of rational designed, multivalent ligands, which include the artificial anion recognition unit GCP. In addition to bind to simple amino acids and to recognize protein surfaces, the synthetic ligands possess the ability to influence complex protein protein interaction. Thus compounds belonging to the rare class of PPI stabilizers could be identified. Furthermore, following up previous research studying the binding of simple nucleotides and DNA to the complex process of gene transfection, these synthetic ligands could successfully be used as transfection vectors. Increasing the binding valency of the ligand

combined with the GCP-moiety improved both the stabilisation effect on PPIs as well as the transfection efficiency of the developed vectors. The results and the facts gained during the examinations shall help to develop artificial ligand systems of future generations and shall be the basis for further research on PPI stabilizers and transfection vectors. Since many questions remained unanswered, barriers not overcome and important aspects neglected; but as *Liebig* once has written „*science becomes attractive where it ends*“.

## 7. Experimentaltteil

---

### 7.1. Material und Geräte

#### Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen *GL Biochem* (Shanghai), *VWR*, *Merck*, *abcr*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Bachem*, *Fischer Scientific*, *Fluka*, *GeneOn*, *Normadur*, *PromoKine*, *Qiagen*, *Roth* und *Sigma Aldrich* bezogen. Argon (Reinheit 99.996 %) wurde über *Air Liquide* bezogen und mit Silicagel Orange getrocknet.

#### Lösemittel

Destilliertes Wasser wurde für chromatografische und spektroskopische Messungen weiter in einer *TKA MicroPure*-Anlage aufbereitet. Methanol wurde in einem Destillationssystem von *ILUDEST* absolutiert. Dichlormethan wurde über Kalziumchlorid vorgetrocknet und anschließend über Kalziumhydrid refluxiert. Das Destillat wurde unter Argon aufbewahrt. Dimethylformamid wurde über Kalziumhydrid unter vermindertem Druck refluxiert und unter Argon in eine Vorlage destilliert, wobei die ersten 200 mL verworfen wurden. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die übrigen Lösungsmittel wie gekauft verwendet.

#### Biomoleküle

Kalbsthymus DNS (ctDNS) wurde von *Sigma Aldrich* bezogen. Die ctDNS (10 mg) wurde in 1.5 mL Natriumcacodylatpuffer (0.01 M, pH 7) gelöst, für 20 Stunden auf 4 °C gekühlt, 8×4 Sekunden mit einem Ultraschallfinger behandelt und durch einen 0.45 µm PTFE Spritzenfilter filtriert. Die Probenkonzentration wurde UV-spektroskopisch mit  $\epsilon_{\text{ctDNS}} = 6600 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 262 nm bestimmt.

Die verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) und humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa und HeLa-Kyoto) wurden von *American Type Culture Collection* bezogen.

Das GFP kodierende Plasmid pF 143 wurde wie in der Literatur beschrieben erhalten.<sup>[557]</sup>

14-3-3 $\zeta$ -Protein wurde von *Maria Bartel* und *Jeroen Briels* aus der Arbeitsgruppe von *Christian Ottmann* an der Technischen Universität Eindhoven exprimiert und für die Experimente zur Verfügung gestellt.

Das FAM-markierte C-RAF-Peptidfragment (FAM)-RQRST-pS-TPNVH-OH ( $M = 1720.6 \text{ g mol}^{-1}$ ) wurde von der Firma *Biosyntan* bezogen. Das unmarkierte C-RAF-Peptidfragment  $\text{H}_2\text{N-RQRST-pS-TPNVH-OH}$  ( $M = 1362.4 \text{ g mol}^{-1}$ ) wurde von *Centic Biotec* geordert.

Das Fam-markierte Tau Protein-Peptidfragment (FAM)-RTP-pS-LPTGGGSGGGSGGSKCG-pS-LGNIHHK-OH ( $M = 3182.19 \text{ g mol}^{-1}$ ) wurde von der Firma *CASLO Laboratory ApS*, Technical University of Denmark, bezogen. Das unmarkierte Tau-Peptidfragment  $\text{H}_2\text{N-RTP-pS-LPTGGGSGGGSGGSKCG-pS-LGNIHHK-OH}$  wurde von *Centic Biotec* geordert.

## HPLC

*Dionex* System (Umkehrphase)

- P680 Pumpe
- ASI-100 automatischer Probensampler
- UVD-340U-UV Detektor
- UltiMate 3000 Säulenofen

Säulen: Umkehrphasensäule (RP18) von *YMC*

- analytisch: YMC-ODS-AQ (150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 12 nm Porengröße)
- semi-präparativ: YMC-ODS-A (150 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 12 nm Porengröße)

Software: Chromeleon 6.80

Als Elutionsmittel wurden ausschließlich Lösungsmittel mit HPLC-Reinheitsgrad und ultrapur aufgearbeitetes Wasser verwendet. Die Läufe wurden immer in einer Mischung aus MeOH + 0.05 % TFA/H<sub>2</sub>O + 0.05 % TFA und einer Flußrate von 0.43 mLmin<sup>-1</sup> durchgeführt. Vor jedem Lauf wurde die Säule 15 Minuten mit dem initialen Laufmittelgemisch equilibriert. Für die erste Analyse wurde ein Gradientenlauf von 10–100 % MeOH + 0.05 % TFA in 30 Minuten verwendet.

## MPLC

*Armen Instrument* Liquid Chromatography Flash Apparatur.

Säule: selbstgepackte Glassäule von *Kronlab* mit RP18 Material von *YMC*

- YMC-ODS-AQ (150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5 µm Partikelgröße, 12 nm Porengröße)

Software: *Armen Glider Flash V2.8m*

Als Elutionsmittel wurden ausschließlich destillierte Lösungsmittel und ultrapur aufgearbeitetes Wasser verwendet. Die Läufe wurden in einer Mischung aus MeOH + 0.05 % TFA/H<sub>2</sub>O + 0.05 % TFA (Gradientenlauf) und einer Flußrate von 15–20 mLmin<sup>-1</sup> durchgeführt. Vor jedem Lauf wurde die Säule mit dem initialen Laufmittelgemisch equilibriert. Nach dem Gradientenlauf wurde die Säule mit 100 % MeOH + 0.05 % TFA gewaschen.

## NMR

- *Bruker DMX 300* (<sup>1</sup>H: 300 MHz; <sup>13</sup>C: 75 MHz),
- *Bruker Avance III HD 600* (<sup>1</sup>H: 600 MHz; <sup>13</sup>C: 150 MHz),
- *Bruker DRX 500* (<sup>1</sup>H: 500 MHz; <sup>13</sup>C: 125 MHz)

Software zur Datenanalyse: *Topspin*

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt mit [D<sub>6</sub>]DMSO oder CDCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden gegen das Lösungsmittelsignal gemessen und werden in ppm angegeben, gegebenenfalls mit Kupplungskonstanten in Hertz. Für die Beschreibung der Feinstruktur der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breites Signal. Die Zuordnung der Signale basiert auf DEPT, 2D-NMR-Untersuchungen und/oder Vergleichen mit Literaturdaten.

## Hochaufgelöste Massenspektrometrie

- *Bruker maXis 4G* (ESI)

Software zur Datenanalyse: *Compass DataAnalysis 4.1* von *Bruker*

Die Proben wurden alle in Methanol, Wasser oder einem Gemisch aus Methanol/Wasser vorbereitet und in einem Konzentrationsbereich von 1–10 × 10<sup>-5</sup> M gemessen. Peptidische Substanzproben wurden zusätzlich mit 0.1 % Ameisensäure versetzt.

## Fluoreszenzpolarisation

- SpectraMax M5e

Software: Softmax Pro 5.4.2.

## ITC

- *Malvern* MicroCal iTC200 Mikrokalorimeter
- *Malvern* VP-ITC Mikrokalorimeter

Software: Origin7 von *OriginLab* mit dem ITC-*plugin* von *MicroCal*.

Die Referenzzellen wurden je mit Millipore Wasser befüllt.

## AFM

- *Veeco* Innova Scanning Probe Mikroskop
- *Veeco* NanoDrive Kontrollmodul
- *HALCYONICS* Micro 40 aktiver Vibrationunterdrücker
- *Olympus* AC 160TS Kantilaver

Software: Gwyddion 2.18

Die Proben wurden auf einer frischen *Mica*-Oberfläche (*Plano*) vorbereitet (6  $\mu$ L, drop cast) und im Tappinmodus bei Raumtemperatur gemessen.

## DLS

- *Malvern* Zetasizer nano zs
- He-Ne-Laser 633 nm

Software: Dispersion Technology Software 5.03

## UV/Vis-Spektroskopie

- *Jasco* V-660
- *Varian* Cary 300 Bio



Für die Experimente wurden Quarzküvetten der Firma *Hellma* mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Hintergrundabsorption der leeren Küvette wurde jeweils vor den Messungen bestimmt und entsprechend abgezogen.

### Fluoreszenzspektroskopie

- *Varian Cary Eclipse*

Alamar-Blue-Viabilitätstest:

- *Promega GloMax-Multo+Detection System*

### Fluoreszenzmikroskopie

- *Carl Zeiss Axiovert 200M*
- Objektive: 10x, 20x oder 40x

Software: MetaMorph 6.3r6 von *Molecular Devices*

### Schmelzpunktbestimmung

- *Büchi B-540*

### FT-IR Spektroskopie

- FT-IR 430 Spektrometer von *Jasco*
- ATR-500M Einheit von *Jasco*

Zur Beschreibung der Intensitäten der Signalbanden werden folgende Abkürzungen verwendet:

(s) stark, (m) mittel, (w) schwach, (br) breit

### allgemeines Laborequipment

Für die Festphasenpeptidsynthese wurde ein Yellowline OS 5 basic Orbitalschwenker von *Heidolph* verwendet. Reaktionslösungen wurden mit einem MR 3001 K von *Heidolph* gerührt oder geheizt. Die Destillation von Lösungsmitteln aus Reaktionsmischungen erfolgte unter vermindertem Druck mit einem *Hei-VAP Advantage Rotary evaporator*-System von *Heidolph* bei einer Badtemperatur von 40°C. Alle hergestellten Produkte wurden mit einem *Christ Alpha 1–4 LD*

plus Gefriertrockner lyophilisiert. Zum zentrifugieren wurde die Rotofix 32 Zentrifuge von *Hettich* verwendet. Die Proben wurden mit dem Vortex Genie 2 von *Scientific Industries* gevortext. Zur Bestimmung der pH-Werte wurde ein pH-Meter 766 Calimatic von *Knick* verwendet. Kalibriert wurde dieses mit kommerziell erhältlichen Pufferlösungen (pH 4 und 7).

## 7.2. Methoden

### 7.2.1. Fluoreszenzpolarisation

Die FP-Experimente wurden in schwarzen, rundbodigen 384-Well-Platten von *Corning*, sofern nicht anders beschrieben, bei 25 °C mit einem finalen Volumen von 10 µL als Triplikat durchgeführt. Für die Experimente wurden FAM-markierte Peptidfragmente von C-RAF und Tau Protein verwendet.

- Endpunkt Fluoreszenz Polarisations Messung
- Anregungswellenlänge 485 nm
- Emissionswellenlänge 535 nm

Peptidfragmente sowie 14-3-3ζ-Protein wurden in frisch zubereiteten FP-Puffer vorbereitet.

**Tabelle 14.** FP-Stammpuffer pH 7.4

Reagenz	Konzentration [M]
HEPES	0.1
NaCl	1.5

Zur Herstellung des FP-Puffers wurden 1 mL des FP-Stammpuffers (Tabelle 14) mit 9 mL *ultrapure* Wasser verdünnt, mit Tween20 und BSA versetzt und durch einen 0.2 µm Spritzenfilter filtriert.

**Tabelle 15.** FP-Puffer pH 7.4

Reagenz	Konzentration
HEPES	10 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0.1 %
BSA	0.1 %

Die Liganden wurden in DMSO in der höchst möglichen Konzentration gelöst.

Die Auswertung der FP-Experimente erfolgte mittels GraphPad Prism. Jede Messung erfolgte als Triplikat, so dass jeder Datenpunkt der Mittelwert dieser drei Messwerte ist und mit der Standardabweichung angegeben wird.

Für die Berechnung der EC<sub>50</sub>-Werte erfolgte die nicht-lineare Anpassung mittels der vier-Parameter Dosis-Wirkungskurve. Die Konzentrationen der Verbindungen wurden vorab logarithmiert.

$$y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{(logEC50 - x) * HillSlope}) \quad (11)$$

Dabei ist y der gemessene Anisotropiewert. X ist log c(Verbindung), Top ist das Plateau der höchsten gemessenen y-Werte, Bottom dementsprechend das Plateau der niedrigsten gemessenen y-Werts und der HillSlope ist die Steigung der Kurve zwischen den y-Werten zwischen der höchsten und niedrigsten Konzentration x. Der EC<sub>50</sub>-Wert ist dann die Konzentration c, die zwischen Bottom und Top liegt, wobei zu beachten ist, dass der Wert nicht einem y-Wert von 50 entspricht.

Für die Berechnung der K<sub>D</sub>-Werte erfolgte mit dem *one-site total binding*-Modell mittels Gleichung 12:

$$y = \frac{Ymax * x}{(Kd + x)} + NS * x + Hintergrund \quad (12)$$

Dabei ist y wieder der gemessene Anisotropiewert. Ymax ist dabei die höchste gemessene Wert y. Die Konzentration c des Liganden ist der x-Wert. Die Bindungskonstante entspricht der Konzentration der Verbindung, die erreicht werden muss um bei Gleichgewichtsbedingungen die halb-maximale Bindung zu erreichen. NS ist die Steigung der Bindungskurve und der Hintergrund ergibt sich aus den Werten der unspezifischen Bindung, wenn keine Verbindung zugegeben wird.

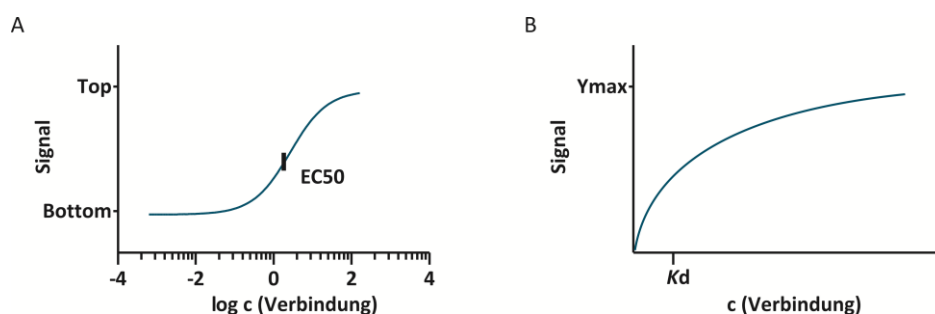


Abbildung 106. Schematische Darstellungen zu den Gleichungen 11 und 12.

## Bestimmung der Bindungskonstanten K<sub>D</sub>

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten wurde eine Verdünnungsreihe von 14-3-3ζ angefangen mit 210 μM über 22 Wells angefertigt. Dazu wurde im 1. Well 14-3-3ζ vorgelegt und dann durch Abnahme von 10 μL jeweils 1 : 1-verdünnt, wobei die letzten 10 μL verworfen wurden. Eine Mischung aus dem jeweiligen Peptidfragment (FAM-C-RAF oder FAM-Tau Protein) wurden vorab mit 1 % DMSO vermischt und mit einer konstanten Konzentration von 0.1 μM mit je 10 μL in die Wells 2–23 vorgelegt.

Tabelle 16. K<sub>D</sub>-Bestimmung: Zugabe 1. Well

Reagenz	Konzentration [μM]	V [μL]
Peptidfragment	C <sub>final</sub> = 0.1 μM	18
DMSO	1 %	
14-3-3ζ	C <sub>final</sub> = 210 μM	2

### Bestimmung der scheinbaren Bindungskonstante $K_{Dapp}$

Die Bestimmung der scheinbaren Bindungskonstanten erfolgte analog zu der oben beschriebenen  $K_D$ -Bestimmung mit Ausnahme, dass anstelle von purem DMSO eine 100  $\mu\text{M}$  Ligandlösung in DMSO mit dem Peptidfragment (FAM-C-RAF oder FAM-Tau Protein) vorgemischt wurde und dann in den Wells vorgelegt wurde.

**Tabelle 17.**  $K_{Dapp}$ -Bestimmung: Zugabe 1. Well

Reagenz	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	V [ $\mu\text{L}$ ]
Peptidfragment	$C_{\text{final}} = 0.1 \mu\text{M}$	18
Ligand	$C_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$	
14-3-3 $\zeta$	$C_{\text{final}} = 210 \mu\text{M}$	2

### $EC_{50}$ -Bestimmung

Für die Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte der Liganden wurde eine 1 : 10-Mischung von FAM-gelabelten Peptidfragment (C-RAF oder Tau Protein,  $c = 0.1 \mu\text{M}$ ) und 14-3-3 $\zeta$  ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) Protein mit konstanter Konzentrationen in die Wells 1–23 vorgelegt. Von den Liganden wurde dann ausgehend von der höchsten möglichen Stammkonzentration eine Verdünnungsreihe über 22 Wells angefertigt, indem von Well 1 10  $\mu\text{L}$  abgenommen wurden und anschließend jeweils 1 : 1-verdünnt wurden, wobei die letzten 10  $\mu\text{L}$  verworfen wurden. Die höchste verwendete Konzentration des Liganden hing von dessen Löslichkeit in DMSO ab und konnte zwischen 1–10 mM variieren.

**Tabelle 18.**  $EC_{50}$ -Bestimmung: Zugabe 1. Well:

Reagenz	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	V [ $\mu\text{L}$ ]
Peptidfragment	$C_{\text{final}} = 0.1$	18
14-3-3 $\zeta$	$C_{\text{final}} = 1$	
Ligand	$C_{\text{final}} = 1000$	2

### 7.2.2. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

#### PPI-Teil

Alle Proben wurden in dem ITC-Puffer mit pH 7.5 vorbereitet.

**Tabelle 19.** ITC-Puffer pH 7.5

Reagenz	Konzentration [mM]
HEPES	25
NaCl	100
MgCl <sub>2</sub>	2
$\beta$ -Mercaptoethanol	4

#### Peptidfragment/14-3-3ζ: Direkte Bindung

Eine 30 μM 14-3-3ζ-Lösung wurde in die Probenzelle gefüllt. Dazu wurde eine Lösung des Peptidfragments (800 μM C-RAF, 600 μM Tau Protein) in 2.4 μL Aliquoten (initial 0.4 μL), mit 120 s zwischen den einzelnen Injektionen, titriert.

#### Peptidfragment/14-3-3ζ: $K_{Dapp}$ -Bestimmung

Eine 30 μM 14-3-3ζ-Lösung wurde mit einem Liganden vorgemischt. Dieses Gemisch wurde in die Probenzelle gefüllt und eine Lösung des Peptidfragments (800 μM C-RAF, 600 μM Tau Protein) in 2.4 μL Aliquoten (initial 0.4 μL) mit 120 s zwischen den einzelnen Injektionen dazutitriert.

#### Ligand **22**/14-3-3ζ: Direkte Bindung

Eine 30 μM 14-3-3ζ-Lösung wurde in der Probenzelle vorgelegt und eine 600 μM Ligand-Lösung in 2.0 μL Aliquoten (initial 0.4 μL) mit 120 s zwischen den einzelnen Injektionen dazutitriert.

### DNS-Teil

Alle Messungen wurden in Natriumcacodylat-Puffer (0.01 M, pH 7.00) durchgeführt. Die Proben wurden vorab mit Helium entgast.

Eine 50 μM Ligand-Lösung wurde in der Probenzelle vorgelegt und eine DNS-Lösung (1.4 bzw. 0.7 mM) in 5 μL Aliquoten (initial 2 μL) mit 300 s zwischen den einzelnen Injektionen dazutitriert.

Die thermalen Titrationsdaten wurden mit dem *two-binding-side*-Modell angepasst, wobei nur die physikalisch sinnvollen Daten verwendet wurden. Der Datenpunkt der initialen Injektion wurde dabei nicht berücksichtigt. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Verdünnungen in Puffer durchgeführt und die Wärmetönung nach linearer Regression von den Titrationsen abgezogen. Mit der Analyse der Daten wurden die (scheinbare) Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), die Reaktionenthalpie ( $\Delta H$ ), die Entropie ( $\Delta S$ ) und die Bindungsstöchiometrie ( $n$ ) ermittelt.

#### 7.2.3. Gelelektrophorese

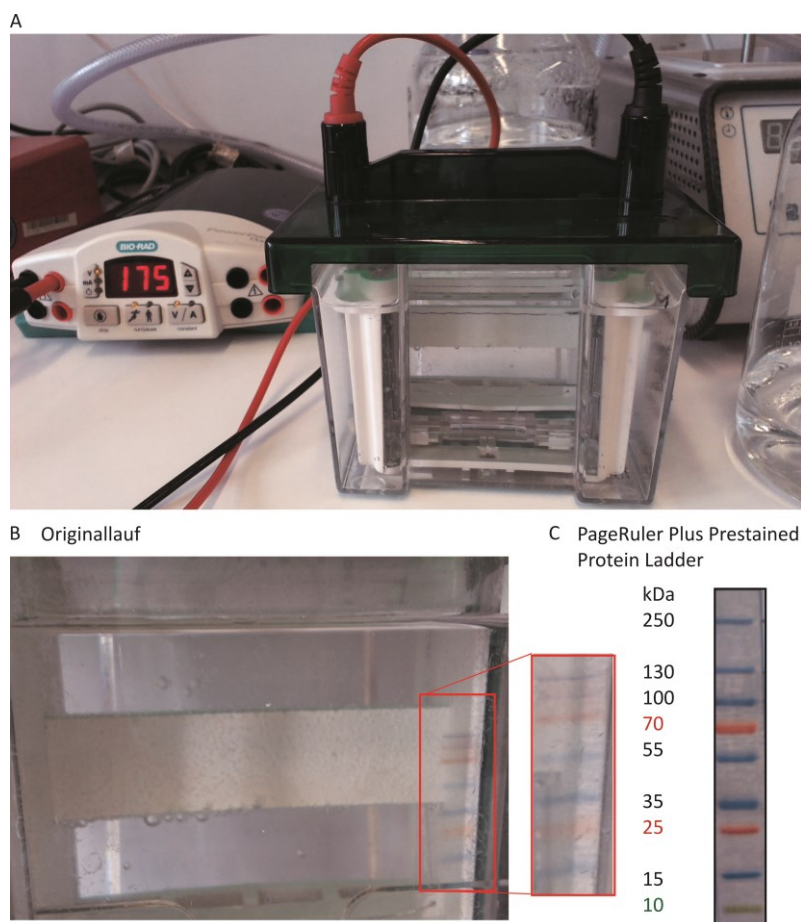
Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgte jeweil mit frisch hergestellten Gelen, deren Zusammensetzung in Tabelle 20 aufgelistet ist. Die Proben wurden alle in Hepes-Puffer pH 7.5 (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) hergestellt und mit einer gesättigten, wässrigen Bromphenolblau Lösung mit 30 % Glycerinanteil versetzt (1 : 5). Als Marker wurde die kommerziell erhältliche *PageRuler Plus Prestained-Protein-Leiter* verwendet.

**Tabelle 20.** Zusammensetzung der Polyacrylamid Gele

Reagenz	Beladungsgel	Trenngel 1	Trenngel 2
Tris, 0.5 M, pH 6.8	400 $\mu$ L	-	-
Tris, 1.5 M, pH 8.8	-	4.4 mL	2.2 mL
Polyacrylamid	850 $\mu$ L	8.3 mL	4.15 mL
APS (10 %)	40 $\mu$ L	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L	8 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Glycerin (86 %)	-	-	0.58 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3.5 mL	6.9 mL	2.87 mL

Das Anfärben des Gels nach dem Lauf erfolgte stets mit einer Coomassie-Blau-Lösung. Für die Bestimmung der 14-3-3 $\zeta$ -Konzentration wurden vier Lösungen des Proteins in Hepes-Puffer pH 7.5 (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) mit den Konzentrationen 1, 10, 20 und 50  $\mu$ M hergestellt. Die Konzentrationen wurden je zweimal getestet. Die Elektrophorese wurde für 105 Minuten bei 175 V durchgeführt.

Für die Kontrollläufe der einzelnen Substanzen und der ersten bi- und tärnären Gemische wurden Lösungen mit den in der Tabelle 20 angegebenen Konzentrationen hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte für 105 Minuten bei 175 V.



**Abbildung 107.** A) Experimenteller Aufbau der Elektrophorese. B) Ausschnitt aus einem Originallauf. C) Proteinleiter PageRuler Plus.

**Tabelle 21.** Beladung des Gels mit den Substanzkontrollen und bi- und ternären Gemischen aus C-RAF, Tau Protein, 14-3-3 $\zeta$  und Ligand **45**

Reagenz	Kammer	Konzentration/ $\mu$ M
14-3-3 $\zeta$	2	10
Tau Protein	5	10
C-RAF	4	20
Ligand <b>45</b>	6	500
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b>	3	10/500
14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein	9	10/10
14-3-3 $\zeta$ /C-RAF	10	10/20
14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein/Ligand <b>45</b>	8	10/10/500
14-3-3 $\zeta$ /C-RAF/Ligand <b>45</b>	7	10/20/500

Für die weiteren Untersuchungen der bi- und ternären Gemische bestehend aus Tau Protein, Ligand **45** und 14-3-3 $\zeta$  wurden Lösungen mit den in der Tabelle 22 angegebenen Konzentrationen hergestellt. Es wurde das Trenngel 2 verwendet, das zusätzlich mit 5 % Glycerin versetzt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 60 Minuten bei 175 V.

**Tabelle 22.** Beladung des Gels mit 14-3-3 $\zeta$ , Tau Protein und Ligand **45** und deren bi- und ternäre Gemische

Reagenz	Kammer	Konzentration/ $\mu$ M
14-3-3 $\zeta$	2, 9	10
14-3-3 $\zeta$ /Tau Protein	10	10/10
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b>	3	10/200
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b>	5	10/100
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b>	7	10/50
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b> /Tau Protein	4	10/200/10
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b> /Tau Protein	6	10/100/10
14-3-3 $\zeta$ /Ligand <b>45</b> /Tau Protein	8	10/50/10

## Coomassie-Blau-Färbung

**Tabelle 23.** Färberlösung

Reagenz	Konzentration/ %
Coomassie Brilliant Blau	0.3
MeOH	45
Eisessig	10
H <sub>2</sub> O	45



**Tabelle 24.** Entfärberlösung

Reagenz	Konzentration/ %
MeOH	20
Eisessig	10
H <sub>2</sub> O	70

Das Gel wird im ersten Schritt mit der Färberlösung beschichtet und langsam für 20–30 Minuten auf einem horizontalen Rotiergerät geschwenkt. Um den Anfärbeprozess zu verkürzen kann eine Mikrowelle verwendet werden, wobei die Essigsäure nicht kochen darf. Die Lösung wird gegebenenfalls nach Abkühlen verworfen und Entfärberlösung für mindestens 20–30 Minuten, meistens aus praktischen Gründen über Nacht, auf das Gel gegeben, wobei der Prozess 3–5 Mal wiederholt werden sollte, bis klare Banden auf dem Gel zu sehen sind ohne blaue Hintergrundfärbung. Hier kann der Prozess ebenfalls durch den Einsatz einer Mikrowelle verkürzt werden.

#### 7.2.4. AFM-Messungen

Die Ligand-Stammlösungen (je 50  $\mu\text{M}$ ) wurden in Wasser angefertigt. 10  $\mu\text{L}$  einer wässrigen, 7.5 %  $\text{MgCl}_2$  enthaltenenden DNS-Lösung (16  $\mu\text{M}$ ), sowie DNS/Ligand-Gemische (0.1 und 0.3 Äquivalente) wurden je auf frische *Mica*-Oberflächen getropft und trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wurden die Proben im *tapping*-Modus untersucht.

#### 7.2.5. DLS-Messungen

Für die DLS-Messungen wurden alle Lösungen in Hepes-Puffer (Tabelle 15) angefertigt. Die Pufferlösungen der Proben wurden vorab durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0.2  $\mu\text{m}$  filtriert.

**Tabelle 25.** DLS-Puffer pH 7.5

Reagenz	Konzentration [mM]
HEPES	25
NaCl	100
$\text{MgCl}_2$	2
$\beta$ -Mercaptoethanol	4

Die triplikat Messungen wurden in UV-transparenten Plastikküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei Raumtemperatur und einem Streuwinkel von 173° mit einer initialen Equilibationszeit von 2 Minuten durchgeführt. Als Kontrollen wurden die Partikelgrößen von je 4 und 20  $\mu\text{M}$  Lösungen von 14-3-3 $\zeta$ , Tau Protein und Ligand **45** gemessen. Desweiteren wurden binäre Gemische aus 14-3-3 $\zeta$  und Tau Protein (1 : 0.7; 1 : 1; 1 : 1.3; 1 : 2.7) und ternär bestehend aus 14-3-3 $\zeta$ , Tau Protein und **45** (1 : 1 : 4) untersucht.

### 7.2.6. EB-Verdrängungsassay

Die Messungen wurden bei 25 °C in Quarz Fluoreszenzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm als triplicat in Natriumcacodylatpuffer (0.01 M, pH 7.00) durchgeführt.

- Messbereich 560–650 nm
- Anregungswellenlänge 520 nm

Zu Beginn wurde die Eigenfluoreszenz von Ethidiumbromid (0.75 µM, 1 Äq.) bestimmt. Dazu wurden 4 Äquivalente ctDNS-Lösung gegeben und nach 15 Minuten Inkubationszeit die Fluoreszenz ermittelt. Zu dieser Mischung wurde in 3×1, 5×2, 4×4, 3×8 und 1×12 µL Aliquoten eine 5 µM Ligandlösung titriert und nach 1 Minute Inkubationszeit je die Fluoreszenz bestimmt. Als Kontrolle wurde die Messung anstelle der Liganden mit Puffer unter analogen Bedingungen durchgeführt.

Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzemission bei 600 nm um die Eigenfluoreszenz von EB und die Verdünnung korrigiert, und gegen das Konzentrationsverhältnis von EB und Ligand aufgetragen. Durch den exponentialen Anpassung erster Ordnung der resultierenden Kurven kann aus dem reziproken x-Wert bei halbmaximaler Fluoreszenz der entsprechende EC<sub>50</sub>-Wert berechnen werden.

### 7.2.7. Transfektions-Assay

In einer durchsichtigen 96-Well Zellkulturplatte (*Greiner*) wurden ca.  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in einem Mediumvolumen von 200 µL D-MEM+++ gesät und in einem Brutschrank für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

D-MEM+++ ist standard Zellkulturmedium (*Dulbecco's modified eagle's media, Invitrogen*) mit zusätzlichen 10 % fetalen Kalbserum, 1 % L-Glutamin, 1 % antibiotischen-antimykotisches Gemisch aus Penicillin G, Streptomycinsulfat und Amphotericin B.

PBS-Puffer (*Invitrogen*)

**Tabelle 26.** PBS-Puffer pH 7.4

Reagenz	Konzentration [mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
NaCl	137
KCl	2.7

Von den jeweiligen Liganden wurden 5 mM Stammlösungen in Wasser hergestellt. Das Plasmid pF 143 (2 µg in 15 µL PBS) wurde mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Liganden in 15 µL PBS vorgemischt und 30 Minuten inkubiert. 30 µL D-MEM+++ wurden jeweils aus den Wells entfernt und 30 µL der DNS-Ligand-Lösung hinzugegeben. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Im Fall von HeLa und HeLa-Kyotozelllinien wurden die Zellen 4 Stunden nach Transfektion gewaschen, indem das Medium entfernt wurde, PBS zugefügt und wieder entfernt wurde und abschließend mit 100 µL frischen D-MEM+++ bedeckt

wurden. Als Kontrolle diente PEI, jetPEI oder Lipofectamin, die je nach Angaben des Herstellers verwendet wurden.

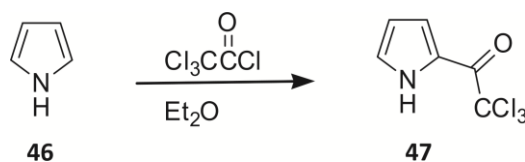
#### 7.2.8. Alamar-Blue-Assay

Die Zellen wurden wie unter 7.2.7. mit den jeweiligen Liganden transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen, die mit Puffer behandelt wurden. Nach 47 Stunden wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{L}$  Alamar-Blue (*Invitrogen*) versetzt und inkubiert. Nach 45 Minuten wurden 10  $\mu\text{L}$  des Überstands abgenommen und mit 90  $\mu\text{L}$  Wasser verdünnt. Bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm wurde die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe bestimmt.

### 7.3. Synthesen

#### 7.3.1. GCP

##### 2-(Trichloracetyl)-1*H*-Pyrrol



Innerhalb von 3 Stunden wurde frisch destilliertes Pyrrol (**46**) (1.00 Äq., 0.50 mol, 33.60 g) zu einer Trichloracetylchloridlösung (1.10 Äq., 0.55 mol, 100.00 g) in 110 mL trockenem Diethylether zugetropft. Reaktionslösung veränderte dabei die Farbe von braun nach violett und wurde anschließend für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die violette Reaktionsmischung wurde dann äußerst vorsichtig und langsam neutralisiert, indem eine wässrige  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung (0.62 Äq. in 150 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) hinzugegeben wurde. (Man beachte, dass dieser Schritt schon mehrere Abzüge versaut hat.) Die dunkle organische Phase wurde abgetrennt und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Zugabe von Aktivkohle wurde die organische Phase für 10 Minuten gerührt und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein brauner, metallisch glänzender Feststoff erhalten werden.

**$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_3\text{NO}$**       212.46  $\text{g mol}^{-1}$

**Ausbeute**      91.80 g, 0.43 mol, 86 %

**Schmelzpunkt** 75 °C

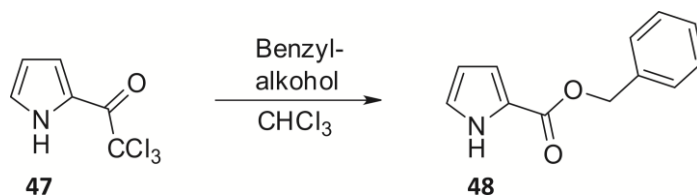
**R<sub>f</sub>**      0.49 ( $\text{SiO}_2$ , DCM)

**$^1\text{H-NMR}$**       (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.37 - 6.41 (m, 1H, CH), 7.15 - 7.18 (m, 1H, CH), 7.37 - 7.40 (m, 1H, CH), 9.43 (bs, 1H, NH) ppm

**$^{13}\text{C-NMR}$**       (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 95.1 ( $\text{C}_q$ ), 112.0, 121.3 (2×CH), 123.1 ( $\text{C}_q$ ), 127.2 (CH), 173.3 ( $\text{C}_q$ ) ppm

**FT-IR**       $\tilde{\nu}$  = 3323 (br s), 2921 (w), 1656 (s), 1536 (w), 1425 (w), 1387 (m), 1137 (m), 1112 (m), 1064 (m), 1036 (m), 843 (w), 756 (m), 740 (m)  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS**      (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_3\text{NO}+\text{H}]^+$  210.9361  $\text{g mol}^{-1}$ , gefunden 210.9358  $\text{g mol}^{-1}$

1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester

Um eine Natriumbenzylat-Lösung zu erhalten, wurde Natrium (0.20 Äq., 0.66 g, 29.00 mmol) zu frisch destillierten Benzylalkohol (1.10 Äq., 16.45 mL, 158.00 mmol) gegeben. Die Natriumbenzylat-Lösung wurde dann zu einer Lösung aus Trichloracetylpyrrol (1.00 Äq., 30.70 g, 145 mmol) in 35 mL Chloroform zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 1 M HCl (0.20 Äq. in 35 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) angesäuert und für weitere 10 Minuten gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Lösung wurde mit 50 mL Wasser versetzt und über Nacht lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan : Ethylacetat : DCM = 7 : 1.5 : 1.5) aufgearbeitet und es konnte ein brauner Feststoff erhalten werden.

**$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$**  201.22  $\text{g mol}^{-1}$

**Ausbeute** 24.95 g, 124.00 mmol, 86 %

**Schmelzpunkt** 55 °C

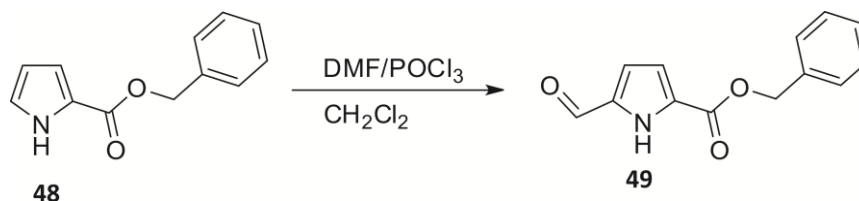
**R<sub>f</sub>** 0.55 ( $\text{SiO}_2$ , Hexan/Ethylacetat/DCM, 70 : 15 : 15)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.31 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.25-6.30 (m, 1H, CH), 6.93-6.99 (m, 2H, 2×CH), 7.30 – 7.45 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{ar.}}$ ), 9.15 (bs, 1H, NH) ppm

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 66.1 ( $\text{CH}_2$ ), 110.7, 115.8 (beide CH), 122.8 ( $\text{C}_q$ ), 123.1 (CH), 128.3, 128.4, 128.7 (alle CH), 136.3 ( $\text{C}_q$ ), 161.0 ( $\text{C}_q$ ) ppm

**FT-IR**  $\tilde{\nu}$  = 3310 (s), 3190 (s), 2325 (m), 2320 (m), 1696 (s), 1420 (s), 1320 (s), 1190 (s), 1130 (s), 735 (m), 745 (m), 765 (m)  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS** (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2+\text{H}]^+$  201.0790  $\text{g mol}^{-1}$ , gefunden 201.0793  $\text{g mol}^{-1}$

5-Formyl-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester

Phosphorylchlorid (2.00 Äq., 0.12 mol, 11.00 mL) wurde tropfenweise zu DMF (5.00 Äq., 0.30 mol, 23.40 mL) bei 5–10 °C gegeben und für 30 Minuten gerührt, um das *Vielsmeier*-Reagenz herzustellen. Verbindung **48** (1.00 Äq., 0.06 mol, 12.10 g) wurde in 250 mL DCM gelöst und auf –15 °C runtergekühlt. Das *Vielsmeier*-Reagenz wurde innerhalb von 15 Minuten dazugetropft und die Reaktionslösung erst für 3 Stunden bei 0 °C und anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 150 mL einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub> Lösung, wurde die gelbe Lösung für 15 Minuten refluxiert. Nachdem die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde nach Filtration, die organische Phase 2 Mal mit *Brine* extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit kaltem Diethylether überschichtet und vorsichtig gerührt. Der dabei ausfallende Feststoff wurde dann durch eine G4-Fritte abgesaugt. Ein brauner Feststoff konnte so erhalten werden.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>**      229.23 g·mol<sup>–1</sup>

**Ausbeute**      9.13 g, 0.04 mol, 65 %

**Schmelzpunkt** 105 °C

**R<sub>f</sub>**      0.55 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan : Ethylacetat : DCM), 70 : 15: 15)

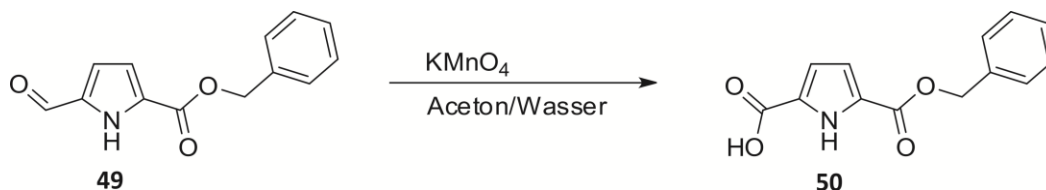
**<sup>1</sup>H-NMR**      (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.93 – 6.99 (m, 2H, 2×CH), 7.35 – 7.44 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 9.66 (s, 1H, CH), 9.83 (bs, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR**      (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 67.2 (CH<sub>2</sub>), 116.1, 119.9 (beide CH), 128.3 (CH), 128.6, 128.7, 128.8 (alle CH), 134.7 (C<sub>q</sub>), 135.4 (C<sub>q</sub>), 160.3 (C<sub>q</sub>), 180.5 (C<sub>q</sub>) ppm

**FT-IR**       $\tilde{\nu}$  = 3280 (s), 2320 (m), 2350 (m), 1690 (s), 1700 (s), 1550 (s), 1390 (s), 1340 (s), 1220 (s), 780 (m), 770 (m), 700 (m) cm<sup>–1</sup>

**HR-MS**      (pos. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 229.0741 g·mol<sup>–1</sup>, gefunden 229.0739 g·mol<sup>–1</sup>

## 1H-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylester



Verbindung **49** (1.00 Äq., 33.80 mmol, 13.35 g) wurde in 125 mL Aceton gelöst und zu dieser Lösung wurden nach und nach 75 mL Wasser zugefügt. Innerhalb einer halben Stunde wurde in kleinen Portionen  $\text{KMnO}_4$  (2.50 Äq., 84.50 mmol, 7.75 g) zugefügt, so dass die Innentemperatur nicht 40 °C überstieg. Danach wurde die violette Lösung erst für 1 Stunde bei 40 °C und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Um das nicht reagierte  $\text{KMnO}_4$  zu inaktivieren, wurde Natriumdithionat (0.10 Äq., 3.38 mmol, 0.59 g) dazu gegeben und das Reaktionsgemisch dann für 10 Minuten gerührt. Der Feststoff wurde durch ein *celite pad* filtriert und mit 150 mL einer 1 M NaOH-Lösung gewaschen. Das Filtrat wurde mit einer 2 M HCl-Lösung angesäuert, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Es konnte ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 75 % (6.17 g, 25.20 mmol) erhalten werden.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>** 245.23 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 6.17 g, 25.20 mmol, 75 %

**Schmelzpunkt** 234 °C (Zersetzung)

**Rf** 0.59 (SiO<sub>2</sub>, DCM/Ethylacetat + Triethylamin, 5 : 5 +1 %)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 5.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.74 – 6.78 (m, 1H, CH), 6.82 – 6.86 (m, 2H, 2×CH), 7.32 – 7.49 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>) 12.56 (s, 1H, NH), 12.84 (s, 1H, COOH) ppm

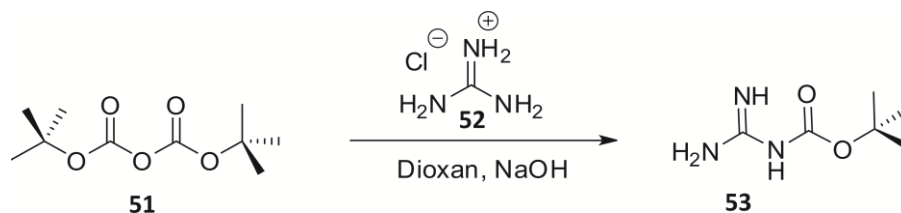
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 65.5 (CH<sub>2</sub>), 115.1, 115.6 (alle CH), 125.9, 127.9 (beide C<sub>q</sub>), 128.0, 128.0, 128.4 (alle CH), 136.2, 159.6, 161.2 (alle C<sub>q</sub>) ppm

**FT-IR**  $\tilde{\nu}$  = 3287 (s), 2360 (m), 2350 (m), 1731 (s), 1730 (s), 1684 (m), 1557 (m), 1277 (s), 770.4 (m), 770.3 (m) cm<sup>-1</sup>

**HR-MS** (pos. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 245.0687 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 245.0688 g mol<sup>-1</sup>



## N-Boc-Guanidin



Innerhalb von 8 Stunden wurde eine gekühlte Lösung (Präzisionstropftrichter) aus Diboc (1.0 Äq., 55.0 mmol, 12.0 g) in 100 mL Dioxan zu einer gekühlten Lösung aus Guanidiniumchlorid (5.0 Äq., 275.0 mmol, 26.3 g) in 50 mL wässriger NaOH-Lösung (5.5 Äq., 303.0 mmol, 12.1 g) getropft. Danach wurde die Suspension für weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde 3 Mal mit jeweils 100 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels unter vermindertem Druck, konnte ein weißer, feinkristalliner Feststoff erhalten werden.

**$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$**  159.19  $\text{g mol}^{-1}$

**Ausbeute** 8.68 g, 54.00 mmol, 99 %

**Schmelzpunkt** 165 °C (Zersetzung)

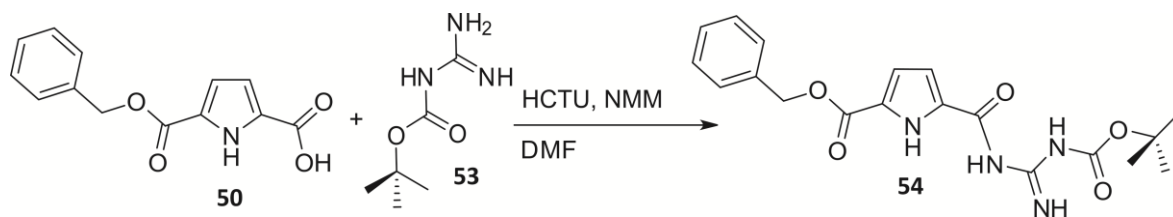
**R<sub>f</sub>** 0.25 ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH + Triethylamin, 5 : 1 +1 %)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 1.34 (s, 9H, 3 $\times\text{CH}_3$ ), 6.18 (bs, 3H, 3 $\times\text{NH}$ ) ppm

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 28.4 ( $\text{CH}_3$ ), 75.8, 162.8, 163.4 (alle  $\text{C}_q$ ) ppm

**FT-IR**  $\tilde{\nu}$  = 3408 (s), 1650 (s), 1540 (s), 1450 (m), 1311 (s), 1253 (m), 1142 (s), 1066 (s), 950 (w), 806 (m)  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS** (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2+\text{H}]^+$  159.101  $\text{g mol}^{-1}$ , gefunden 159.101  $\text{g mol}^{-1}$

1*H*-Pyrrol-5-(*N*-Boc-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäurebenzylester

Die Pyrrolcarbonsäure **50** (1.0 Äq., 8.0 mmol, 2.0 g) wurde in 20 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden NMM (2.2 Äq., 17.6 mmol, 2.0 mL) und HCTU (1.1 Äq., 9.0 mmol, 3.7 g) gegeben und 30 Minuten rühren gelassen, um den Aktivester zu bilden. Anschließend wurde Boc-Guanidin (**53**) (2 Äq., 16.0 mmol, 2.6 g) und zusätzliche 7 mL DMF zugefügt. Die braune Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in 100 mL gekühltes Wasser eingerührt. Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, welcher in 100 mL Diethylether gelöst wurde. Die wässrige Phase wurde 2 Mal mit jeweils 100 mL Diethylether extrahiert. Die gelben organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Ein hellbrauner Feststoff konnte erhalten werden.

**C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>** 386.40 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 2.9 g, 7.4 mmol, 93 %

**Schmelzpunkt** 88 °C

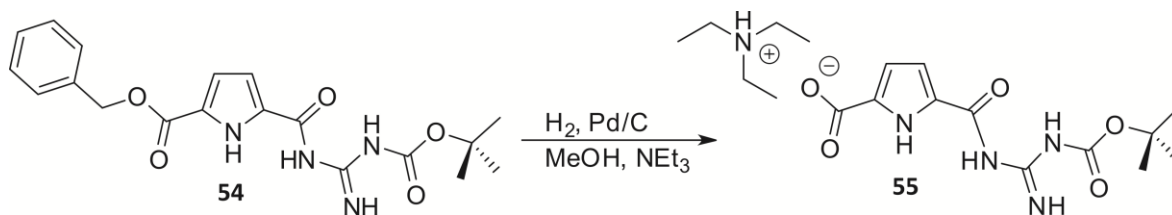
**RF** 0.51 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Ethylacetat + Triethylamin, 3 : 2 + 1 %)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.47 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 5.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.80 – 6.85 (m, 2H, 2×CH), 7.31 – 7.47 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 8.58 (bs, 1H, NH), 9.32 (bs, 1H, NH), 10.76 (bs, 1H, NH), 11.64 (bs, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 27.7 (CH<sub>3</sub>), 65.5 (CH<sub>2</sub>), 81.2 (C<sub>q</sub>), 113.84 115.75 (beide CH), 124.52 (C<sub>q</sub>), 127.88, 128.02, 128.44 (alle CH), 133.97, 136.22, 155.56, 158.30, 159.77, 168.04 (alle C<sub>q</sub>) ppm

**FT-IR**  $\tilde{\nu}$  = 3393 (m), 3256 (m), 2360 (s), 2340 (m), 1719 (s), 1717 (s), 1635 (s), 1540 (s), 1286 (s), 1149 (s), 842 (w) cm<sup>-1</sup>

**HR-MS** (pos. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>+Na]<sup>+</sup> 409.1460 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 409.1490 g mol<sup>-1</sup>

1*H*-Pyrrol-5-(*N*-Boc-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäure

Eine katalytische Menge Pd/C (ca. 200 mg) wurde in 70 mL MeOH suspendiert. Dazu wurde Verbindung **54** (1.00 Äq., 12.00 mmol, 4.65 g) gegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre für 5 Stunden bei 40 °C gerührt. Die Suspension wurde durch ein *Celite Pad* filtriert, der Feststoff mit 3 % Triethylamin (1.50 Äq., 18.10 mmol) in 70 mL MeOH gewaschen und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Nach Zugabe von 20 mL H<sub>2</sub>O wurde die Lösung über Nacht lyophilisiert und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden.

**C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>**    397.47 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute**    2.01 g, 5.00 mmol, 75 %

**Schmelzpunkt** 300 °C

**RF**    0.64 (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH + Triethylamin, 8 : 2 +1 %)

**<sup>1</sup>H-NMR**    (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.06 (t, 9H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.2 Hz, NEt<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 2.77 (q, 6H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.2 Hz, NEt<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 6.52 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3.6 Hz, 1H, CH), 6.77 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3.8 Hz, 1H, CH), 8.57 (br s, 1H, NH), 9.33 (br s, 1H, NH), 10.91 (br s, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR**    (75 MHz, DMSO<sub>6</sub>) δ = 9.7 (NEt<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>), 27.8 (CH<sub>3</sub>), 45.2 (NEt<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 80.2 (C<sub>q</sub>), 112.1, 114.1 (beide CH), 128.8, 133.0, 158.5, 160.6, 163.9, 167.2 (alle C<sub>q</sub>) ppm

**FT-IR**     $\tilde{\nu}$  = 3393 (m), 2958 (w), 1650 (s), 1542 (s), 1319 (s) cm<sup>-1</sup>

**HR-MS**    (neg. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 295.1048 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 295.1048 g mol<sup>-1</sup>

## 7.3.2. Festphasenpeptidsynthese

### 7.3.2.1. Allgemeine Vorgehensweise

Die Festphasenpeptidsynthese wurde in einem, mit einer Fritte modifizierten, Schlenckgefäß durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden unter Argonatmosphäre auf einem Orbitalschüttler geschwenkt. Das jeweilige Lösungsmittelvolumen wurde an die Reaktanden angepasst, sodass diese in einem Konzentrationsbereich von 0.1–0.2 M vorlagen. Als feste Phase wurde **Rink Amid MBHA-Harz**, welches vor der eigentlichen Reaktion 2 Stunden zum Quellen in 10 mL DCM gegeben wurde. Nach dem Quellen wurde das Harz 2× für 5 Minuten mit 10 mL DMF gewaschen. Kupplungen und Entschützungen wurden mit dem sogenannten Kaiser Test auf Vollständigkeit verfolgt und überprüft.

### Kaiser Test

Für den Kaiser Test wurden zwei Lösungen hergestellt. Für **Lösung A** wurde **1 g Ninhydrin in 10 mL Ethanol** und für **Lösung B** **40 g Phenol ebenfalls in 10 mL Ethanol** gelöst. Ein kleiner Teil des Harzes wurde in ein separates Gefäß überführt und mit 0.6 mL einer 1 : 1-Mischung aus Lösung A und B versetzt. Nach Erhitzen auf 100 °C für 2 Minuten konnte der Test ausgewertet werden. Ein positiver Kaiser Test zeigt freie Aminofunktionen an, indem sich die Harzkugeln blauviolett verfärben. Bei einem negativen Resultat bleiben die Harzkugeln durchsichtig klar.

### Fmoc-Entschützung

Die Fmoc-Entschützung erfolgte durch Zugabe einer **20 %igen Piperidinlösung in DMF** zu dem Harz. Die 20-minütige Prozedur wurde wiederholt, gefolgt von einem intensiven Waschzyklus (mindestens 6×5 Minuten je 10 mL DMF), bis zu einem positiven Kaiser Test.

### Alloc-Entschützung

Die Alloc-Entschützung erfolgte durch Zugabe von **Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 Äq.)** und **PhSiH<sub>3</sub> (24 Äq.)** in DCM für 2×20 Minuten. Das Harz wurde anschließend 3× mit DCM und weitere 3× mit DMF gewaschen (je 5 Minuten). Mittels Kaiser Test wurde der Fortschritt der Entschützung geprüft und diese wurde wenn nötig wiederholt.

### Kupplung

Für die Kupplung wurden die Fmoc-geschützten L-Aminosäuren (Fmoc-Glycin-OH, Fmoc-Phenylalanin-OH, Fmoc-Lysine(Boc)-OH, Fmoc-Lysin(Fmoc)-OH, Fmoc-Arginin(Pbf)-OH), die teils

orthogonal mit Boc oder Pbf geschützt waren, bzw. der Boc-geschützte GCP-Baustein zum Harz gegeben und in DMF gelöst. Nach Zugabe des **Kupplungsreagenz PyBOP und der Base DIPEA**, wurde das Reaktionsgemisch für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Kupplung wurde bis zu einem negativen Resultat des Kaisertestes wiederholt. Für die End-Kappung wurde eine Lösung aus  $\text{Ac}_2\text{O}$  und DIPEA in DMF für 1 Stunde zu dem Harz gegeben.

### Abspaltung und Entschützung

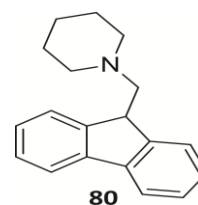
Die Abspaltung des Peptids vom Harz und die finale Entschützung wurden durch einen intensiven Waschzyklus mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 Minuten) eingeleitet. Nach Trocknung des Harzes bei 20 mbar für eine Stunde, wurde eine Mischung aus **TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5)** zu dem Harz gegeben. Nach 4 stündigen schwenken bei Raumtemperatur wurde die Lösung abfiltriert und gesammelt. Das Harz wurde weitere 2 Male mit TFA gewaschen. Die vereinten Lösungen wurden unter vermindertem Druck eingengt bis ein öliges Rückstand zurückblieb. Durch Zugabe von kaltem Diethylether zu dem öligen Rückstand fiel ein weiß-gelblicher Feststoff aus. Die Suspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 2× für 15 Minuten bei 20 000 rpm zentrifugiert, wobei zwischen den Schritten der Ether vom Überstand entfernt wurde und anschließend der Feststoff in frischem Ether resuspendiert wurde. Danach wurde der Feststoff in Wasser gelöst und lyophilisiert.

### Aufarbeitung

Das Rohprodukt wurde mittels Umkehrphasen-MPLC aufgearbeitet und die Reinheit mittels analytischer HPLC verfolgt. Um das HCl-Salz zu erhalten, wurde der Feststoff mit einer wässrigen 0.1 N HCl-Lösung versetzt und lyophilisiert. Der Schritt wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt. Die Reinheit des Produktes wurde ebenfalls mittels analytischer HPLC überprüft.

### Beladung des Harzes

Die Beladung des Harzes kann über die Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts via UV/Vis-Spektroskopie ermittelt werden. Das Harz wurde exakt eingewogen und für 2 Stunden in DCM gequollen. Dem Harz wurden nach 3-fachen Waschen mit je 5 mL DMF (je 5 Minuten) 5 mL Piperidinlösung (20 % in DMF) zugesetzt, um die Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten. Die Lösung wurde abgesaugt und aufgefangen, das Harz mit weiteren 5 mL DMF gewaschen, und wiederholt mit der Piperidinlösung versetzt. Nach einem intensiven Waschzyklus mit je 5 mL DMF (6×5 Minuten) wurden die



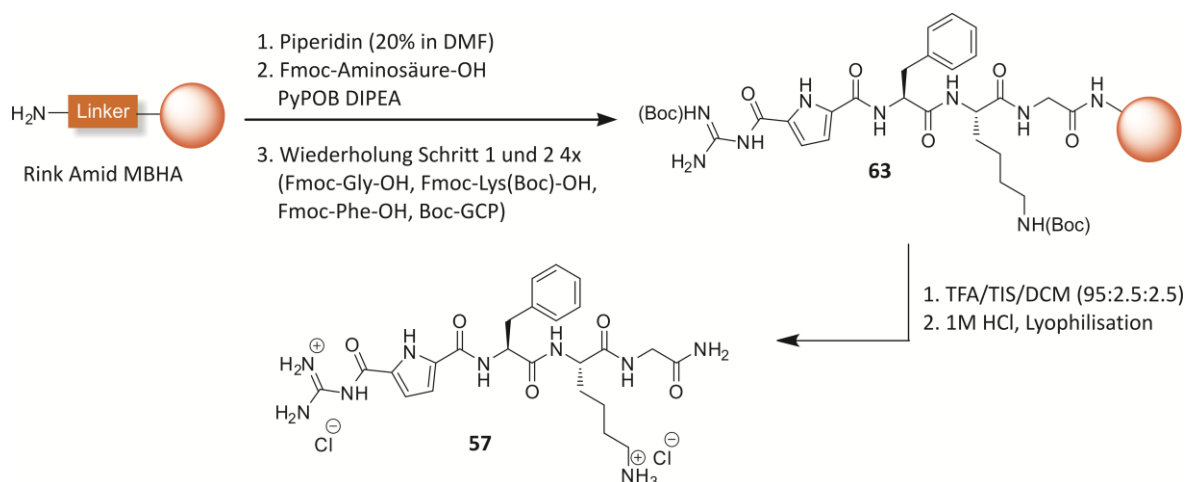
**Abbildung 108.** Dibenzofulven-Piperidin-Addukt.

Waschlösungen mit der Abspalllösung vereint, so dass 45 mL des Piperidin/DMF-Gemisches erhalten wurden. Der Kaiser-Test bestätigte das Vorhandensein freier Aminogruppen. 1 mL der Lösung wurde in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke überführt und das UV-Spektrum von 200–400 nm aufgenommen. Das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 301 nm detektiert werden. Unter Zuhilfenahme des *Lambert-Beerschen*-Gesetzes ( $E = cd\varepsilon$ ) kann die Konzentration des Adduktes berechnet werden (mit einem spezifischen Absorptionskoeffizient  $\varepsilon = 7800 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Beladung des Harzes  $B$  (in  $\text{mmol g}^{-1}$ ) kann dann über Gleichung 10 berechnet werden.

$$B = \frac{E}{d \varepsilon} \frac{Fv V}{m} \quad (10)$$

Mit  $F_v$  dem Verdünnungsfaktor,  $V$  das Volumen der gesammelten Lösung (hier 45 mL) und  $m$  die Einwaage des Harzes.

### 7.3.2.2. GCP-Phe-Lys-Gly-NH<sub>2</sub> (**57**)



Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.8	1	0.13	161	
PyBOP		4	0.52	268	
DIPEA		5	0.65	83	112
Fmoc-Gly-OH		4	0.52	153	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		4	0.52	241	
Fmoc-Phe-OH		4	0.52	200	
Boc-GCP		4	0.52	205	

Die Festphasenpeptidsynthese von **57** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde das *Rink Amid* MBHA-Harz zunächst für 2 Stunden in 10 mL DCM quellen gelassen und anschließend 2× mit DMF gewaschen (je 5 mL). Nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) wurde die erste Aminosäure Glycin an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt. Die Kupplung wurde wiederholt. Die Aminosäuren Lysin und Phenylalanin sowie das Bindungsmotiv GCP wurden jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingedunstet. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 20 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und

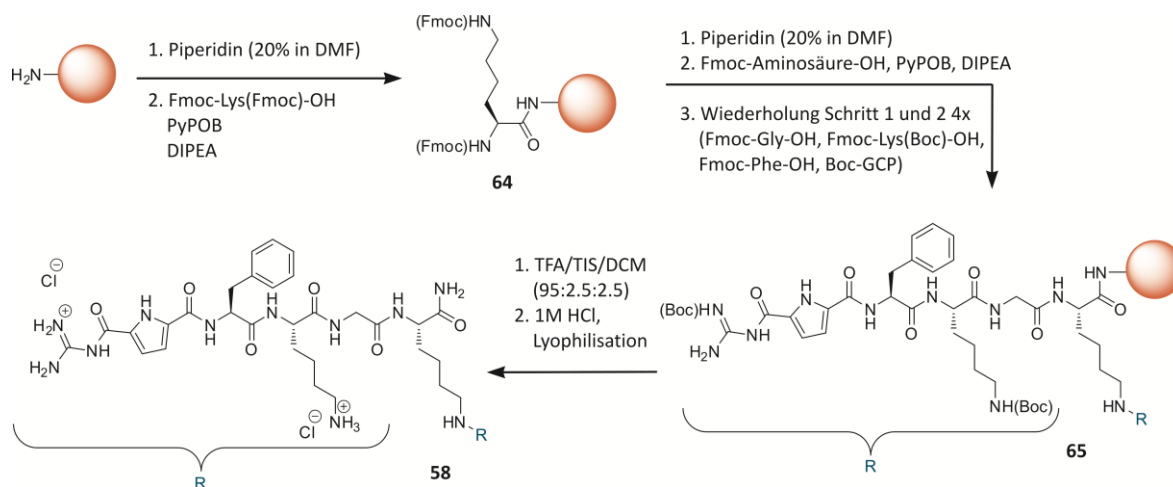


nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 78 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach der Reinigung mittels MPLC (78 mg: 20–80 % MeOH+0.05 % TFA in 60 Min, 70–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 3 Min), konnte ein weißer, voluminöser Feststoff erhalten werden. Zum Umsaltzen wurden die 47 mg Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (2×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub>** 600.50 g mol<sup>-1</sup>

<b>Ausbeute</b>	Rohprodukt (TFA-Salz): 78 g, 0.11 mmol, 84 %, Produkt (HCl-Salz): 39 mg, 0.065 mmol, 50 %
<b>HPLC</b>	(RP18) 20–60 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, R <sub>f</sub> = 13.1 Min, >95 %; 10–100 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, R <sub>f</sub> = 13.4 Min, >95 %
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO) δ = 1.289–1.373 (m, 2H, Lys-CH <sub>2</sub> ), 1.493–1.597 (m, 3H, Lys-CH <sub>2</sub> ), 1.686–1.760 (m, 1H, Lys-CH <sub>2</sub> ), 2.729–2.781 (m, 2H, Lys-εCH <sub>2</sub> ), 2.854–2.895 (m, 1H, Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.130–3.161 (m, 1H, Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.611–3.693 (m, 2H, Gly-αCH <sub>2</sub> ), 4.226–4.262 (m, 1H, Lys-αCH), 4.747–4.784 (m, 1H, Phe-αCH), 6.845 (s, 1H, Pyrrol-CH), 7.050–7.108 (m, 2H, Pyrrol-CH, NH), 7.152–7.177 (m, 1H, Phe-CH <sub>ar</sub> ), 7.232–7.272 (m, 3H, Phe-CH <sub>ar</sub> ), 7.309–7.339 (m, 2H, Phe-CH <sub>ar</sub> ), 7.647 (s, 3H, Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 7.991–8.012 (m, 1H, Gly-NH), 8.430–8.416 (m, 5H, 1 Lys-NH, 4 NH), 8.694–8.679 (d, 1H, 1 Phe-NH), 11.211 (s, 1H, Gua-NH), 12.463 (br s, 1H, Pyrrol-NH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO) δ = 22.178 (Lys-CH <sub>2</sub> ), 26.611 (Lys-CH <sub>2</sub> ), 31.120 (Lys-CH <sub>2</sub> ), 37.342 (Phe-CH <sub>2</sub> ), 38.708 (Lys-CH <sub>2</sub> ), 41.757 (Gly-CH <sub>2</sub> ), 52.699 (Lys-αCH), 54.154 (Phe-αCH), 113.435 (Pyrrol-CH), 115.059 (Pyrrol-CH), 116.211 (Pyrrol-C <sub>q</sub> ), 118.253 (Pyrrol-C <sub>q</sub> ), 126.318 (Phe-CH), 128.099 (Phe-CH), 129.094 (Phe-CH), 137.945 (Phe-C <sub>q</sub> ), 157.898 (Phe-CO), 158.108 (C <sub>q</sub> ), 158.317 (C <sub>q</sub> ), 158.527 (C <sub>q</sub> ), 158.841 (C <sub>q</sub> ), 170.729 (Gly-CO), 171.462 (Lys-CO) ppm
<b>HR-MS</b>	(pos. ESI) <i>m/z</i> berechnet für [C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub> +H] <sup>+</sup> 528.2677 g mol <sup>-1</sup> , gefunden 528.2690 g mol <sup>-1</sup>

### 7.3.2.3. (GCP-Phe-Lys-Gly)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (**58**)



Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.8	1	0.27	336	
PyBOP		4	1.08	560	
DIPEA		5	1.35	174	235
Fmoc-Gly-OH		4	1.08	320	
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	1.08	635	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		4	1.08	504	
Fmoc-Phe-OH		4	1.08	417	
Boc-GCP		4	1.08	427	

Die Festphasenpeptidsynthese von **58** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde das *Rink Amid* MBHA-Harz zunächst für 2 Stunden in 10 mL DCM quellen gelassen und danach 2 Mal mit DMF gewaschen (je 5 mL). Nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) wurde die erste zweifach Fmoc-geschützte Aminosäure Lysin an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt, um den Aufbau der zweiarmigen Verbindung zu ermöglichen. Die Aminosäuren Glycin, Lysin und Phenylalanin sowie das Bindungsmotiv GCP wurden jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen, aber nur 2 Äq. pro Arm, an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingedunstet. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 20 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals

zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 286 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach MPLC (A 286 mg: 20–80 % MeOH+0.05 % TFA in 60 Min, 80–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 3 Min; B 200 mg: 50–80 % MeOH+0.05 % TFA in 60 Min, 80–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 3 Min) konnte 98 mg ein weißer voluminöser Feststoff erhalten werden. Zum Umsalzen wurden 12 mg des Feststoffs mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (3×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>54</sub>H<sub>79</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>19</sub>O<sub>11</sub>** 1312.14 g mol<sup>-1</sup>

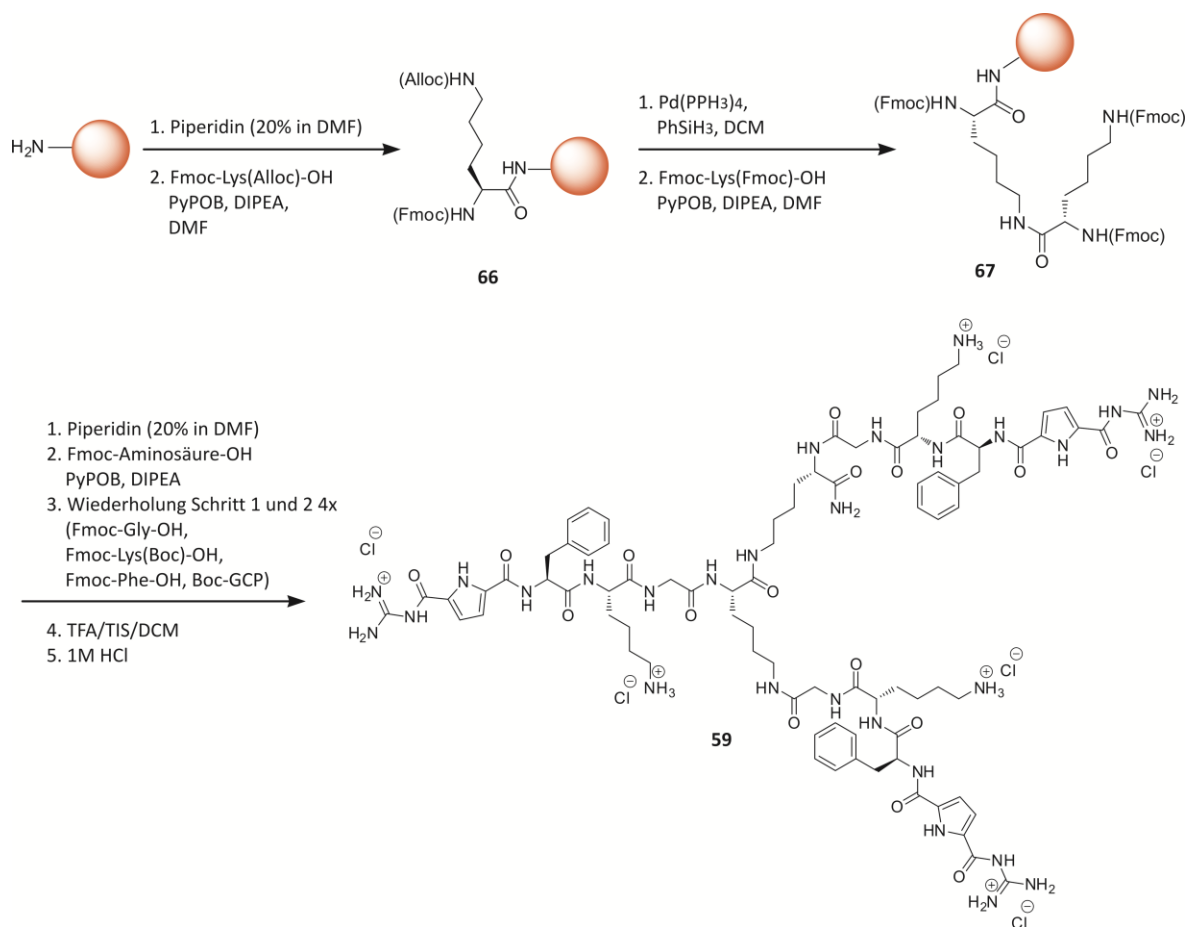
**Ausbeute** Rohprodukt (TFA-Salz): 286 g, 0.18 mmol, 68 %, Produkt (HCl-Salz): 10 mg, 0.08 mmol, 4 %; (TFA-Salz): 86 mg, 0.055 mmol, 26 %

**HPLC** (RP18) 10–100 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min R<sub>f</sub> = 16.6 Min, >90 %

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 1.202–1.404 (m, 10 H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.468–1.589 (m, 8H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.629–1.731 (m, 4H, Lys-CH<sub>2</sub>), 2.722–2.773 (m, 4 H, Lys-εCH<sub>2</sub>), 2.850–2.897 (m, 2H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.002–3.047 (m, 4H, Lys<sub>Grundgerüst</sub>-εCH<sub>2</sub>), 3.124–3.147 (m, 2H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.684–3.766 (m, 4H, Gly-αCH<sub>2</sub>), 4.133–4.169 (m, 1H, Lys<sub>Grundgerüst</sub>-αCH), 4.252–4.301 (m, 2H, Lys-αCH), 4.753–4.790 (m, 2H, Phe-αCH), 6.849 (s br, 2H, Pyrrol-CH), 7.038–7.077 (m, 3H, Pyrrol-CH, NH), 7.147–7.173 (m, 2H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.232–7.258 (m, 4H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.310–7.324 (m, 4H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.357 (s, 1H, NH), 7.654 (s br, 6H, Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.820–7.839 (m, 1H, Lys-NH), 7.914–7.927 (m, 1H, Lys-NH), 8.006–8.054 (m, 2H, Gly-NH), 8.326–8.448 (m, 8H, 1 Lys-NH, 8 NH), 8.651–8.658 (br s, 2H, 2 Phe-NH), 11.232 (br s, 1H, NH), 12.455 (br s, 1H, Pyrrol-NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 22.170 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.226 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.789 (Lys-CH<sub>2</sub>), 26.647 (Lys-CH<sub>2</sub>), 28.790 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.218 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.359 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.887 (Lys-CH<sub>2</sub>), 37.349 (Phe-CH<sub>2</sub>), 38.486 (Lys-CH<sub>2</sub>), 38.740 (Lys-CH<sub>2</sub>), 41.862 (Gly-CH<sub>2</sub>), 52.312 (Lys-αCH), 52.570 (Lys-αCH), 54.080 (Phe-αCH), 54.182 (Phe-αCH), 113.420 (Pyrrol-CH), 115.201 (Pyrrol-CH), 116.220 (Pyrrol-C<sub>q</sub>), 118.166 (Pyrrol-C<sub>q</sub>), 126.300 (Phe-CH), 128.081 (Phe-CH), 129.083 (Phe-CH), 132.109 (C<sub>q</sub>), 137.927 (Phe-C<sub>q</sub>), 154.928 (C<sub>q</sub>), 158.111 (C<sub>q</sub>), 158.353 (C<sub>q</sub>), 158.812 (C<sub>q</sub>), 159.756 (C<sub>q</sub>), 168.331 (C<sub>q</sub>), 168.466 (C<sub>q</sub>), 171.328 (C<sub>q</sub>), 171.412 (C<sub>q</sub>), 171.509 (C<sub>q</sub>), 171.702 (C<sub>q</sub>), 173.563 (C<sub>q</sub>) ppm

**HR-MS** (pos. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>54</sub>H<sub>75</sub>N<sub>19</sub>O<sub>11</sub>+2H]<sup>2+</sup> 583.8019 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 583.8014 g mol<sup>-1</sup>

7.3.2.4. (GCP-Phe-Lys-Gly)<sub>3</sub>-(Lys)-Lys-NH<sub>2</sub> (59)


Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.6	1	0.24	400	
PyBOP		2	0.48	250	
		6	1.44	749	
DIPEA		6	1.44	186	252
		12	2.88	372	504
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		2	0.48	284	
Fmoc-Lys(Alloc)-OH		2	0.48	217	
PhSiH <sub>3</sub>		0.1	0.024	28	
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>		24	5.76	623	
Fmoc-Gly-OH		6	1.44	428	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		6	1.44	675	
Fmoc-Phe-OH		6	1.44	558	
Boc-GCP		6	1.44	572	

Die Festphasenpeptidsynthese von **59** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurden 400 mg *Rink Amid* MBHA-Harz zunächst für 2 Stunden in 10 mL DCM quellen gelassen und danach 2 Mal mit DMF gewaschen (je 5 mL). Nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) wurde die erste Aminosäure Fmoc-Lysin(Alloc)-OH an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt, um den Aufbau der dreiararmigen Verbindung zu ermöglichen. Dafür wurde zunächst die Seitenkette von Lysin Alloc-entschützt mit einer Mischung aus  $\text{PhSiH}_3$  und  $\text{Pd}(\text{PPH}_3)_4$  in 10 mL DCM. Das Prozedere wurde wiederholt und das Harz anschließend erst 3× mit DCM und 3× mit DMF (je 5 mL, 5 Min) gewaschen. Dann wurde das zweifach Fmoc-geschützte Lysin an die Seitenkette gekuppelt. Nach der darauffolgenden Fmoc-Entschützung waren so drei freie Amine vorhanden und die Aminosäuren Glycin, Lysin und Phenylalanin sowie das Bindungsmotiv GCP wurden jeweils mit 2 Äq. pro Arm an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit einer 9:1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 25 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 491 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach zwei RP-Gradienten-MPLC-Läufen (A 491 mg: 42–60 % MeOH+0.05 % TFA in 40 Min, 60–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; B 198 mg: 50–55 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 55–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min) konnten 42 mg eines weißen voluminösen Feststoffs erhalten werden. Zum Umsalzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (5×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde, das entspricht einer Ausbeute von 8 % (0.02 mmol, 37 mg).

**C<sub>84</sub>H<sub>123</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>29</sub>O<sub>17</sub>**      2023.78 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute**              Rohprodukt(TFA-Salz): 491 g, 0.21 mmol, 86 %, Produkt (HCl-Salz): 37 mg, 0.02 mmol, 8 %

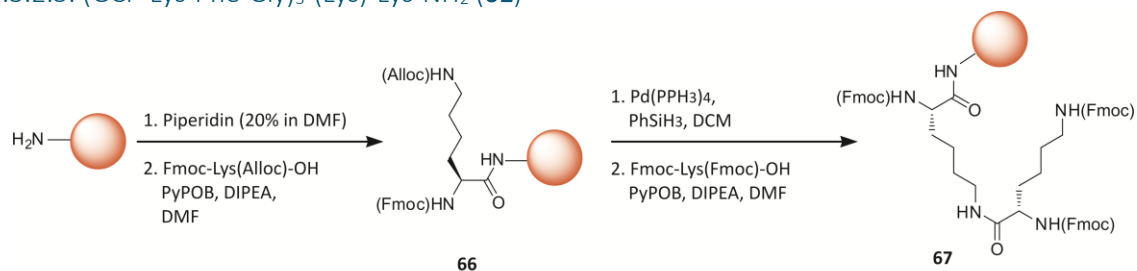
**HPLC**                  (RP18) 40–50 % MeOH+0.05 % TFA in 35 Min, R<sub>f</sub> = 10.4 Min, 220 nm >80 %

**<sup>1</sup>H-NMR**            (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 1.210-1.448 (m, 14H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.501-1.608 (m, 12H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.658-1.810 (m, 6H, Lys-CH<sub>2</sub>), 2.705-2.790 (m, 7H, 6 Lys-εCH<sub>2</sub>), 2.846-2.943 (m, 3H, Phe-CH<sub>2</sub>), 2.972-3.067 (m, 3H, 2 Lys-εCH<sub>2</sub>), 3.083-3.187 (m, 5H, 3 Phe-CH<sub>2</sub>, 2 LysGrundgerüst-εCH<sub>2</sub>), 3.666-3.837 (m, 6H, Gly-αCH<sub>2</sub>), 4.152-4.337 (m, 5H, 2 LysGrundgerüst-αCH, 3 Lys-αCH), 4.738-4.813 (m, 3H, Phe-αCH), 6.832-6.875 (m, 3H,

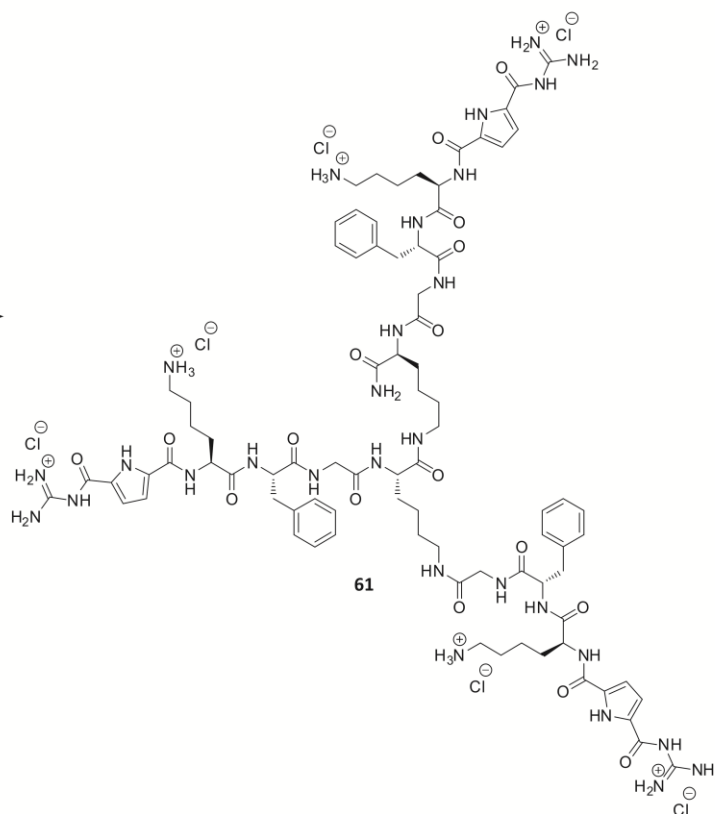
Pyrrol-CH), 7.099 (s br, 2H, NH), 7.131-7.198 (m, 5H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.220-7.284 (m, 9H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.313-7.359 (m, 6H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.467-7.537 (m, 3H, Pyrrol-CH), 7.753-7.993 (m, 12H, 9 Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH), 8.047-8.148 (m, 4H, 3 Gly-NH), 8.208-8.280 (m, 2H, NH), 8.387-8.475 (m, 7H, Lys-NH), 8.568-8.687 (m, 6H, NH), 8.723-8.772 (m, 2H, 2 Phe-NH), 12.442 (br s, 3H, NH), 12.621 (br s, 3H, Pyrrol-NH), 12.614 (br s, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)  $\delta$  = 22.095 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.150 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.417 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.783 (Lys-CH<sub>2</sub>), 26.484 (Lys-CH<sub>2</sub>), 26.515 (Lys-CH<sub>2</sub>), 28.512 (Lys-CH<sub>2</sub>), 30.298 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.280 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.409 (Lys-CH<sub>2</sub>), 37.324 (Phe-CH<sub>2</sub>), 38.537 (Lys-CH<sub>2</sub>), 38.590 (Lys-CH<sub>2</sub>), 40.053 (CH<sub>2</sub>), 40.613 (CH<sub>2</sub>), 51.799 (Lys- $\alpha$ CH), 52.235 (Lys- $\alpha$ CH), 52.563 (Lys- $\alpha$ CH), 53.993 (Phe- $\alpha$ CH), 54.197 (Phe- $\alpha$ CH), 113.390 (Pyrrol-CH), 115.801 (Pyrrol-CH), 125.653 (CH), 126.314 (CH), 128.100 (CH), 129.145 (CH), 132.189 (C<sub>q</sub>), 138.025 (C<sub>q</sub>), 153.036 (C<sub>q</sub>), 155.408 (C<sub>q</sub>), 155.575 (C<sub>q</sub>), 158.677 (C<sub>q</sub>), 158.710 (C<sub>q</sub>), 158.859 (C<sub>q</sub>), 159.710 (C<sub>q</sub>), 168.665 (C<sub>q</sub>), 169.041 (C<sub>q</sub>), 171.079 (C<sub>q</sub>), 171.258 (C<sub>q</sub>), 171.352 (C<sub>q</sub>), 171.471 (C<sub>q</sub>), 171.548 (C<sub>q</sub>), 171.642 (C<sub>q</sub>), 171.719 (C<sub>q</sub>), 173.356 (C<sub>q</sub>) ppm

**HR-MS** (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für [C<sub>84</sub>H<sub>117</sub>N<sub>29</sub>O<sub>17</sub>+2H]<sup>2+</sup> 903.4678 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 903.4110 g mol<sup>-1</sup>

7.3.2.5. (GCP-Lys-Phe-Gly)<sub>3</sub>-(Lys)-Lys-NH<sub>2</sub> (**61**)

1. Piperidin (20% in DMF)
2. Fmoc-Aminosäure-OH  
PyBOB, DIPEA, DMF
3. Wiederholung Schritt 1 und 2 4x  
(Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,  
Fmoc-Phe-OH, Boc-GCP)
4. TFA/TIS/DCM (95:2.5:2.5)
5. 1M HCl, Lyophilisation



Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.6	1	0.24	403	
PyBOP		2	0.48	250	
		6	1.44	749	
DIPEA		6	1.44	186	252
		12	2.88	372	504
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		2	0.48	284	
Fmoc-Lys(Alloc)-OH		2	0.48	217	
PhSiH <sub>3</sub>		0.1	0.024	28	
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>		24	5.76	623	
Fmoc-Gly-OH		6	1.44	428	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		6	1.44	675	
Fmoc-Phe-OH		6	1.44	558	
Boc-GCP		6	1.44	572	



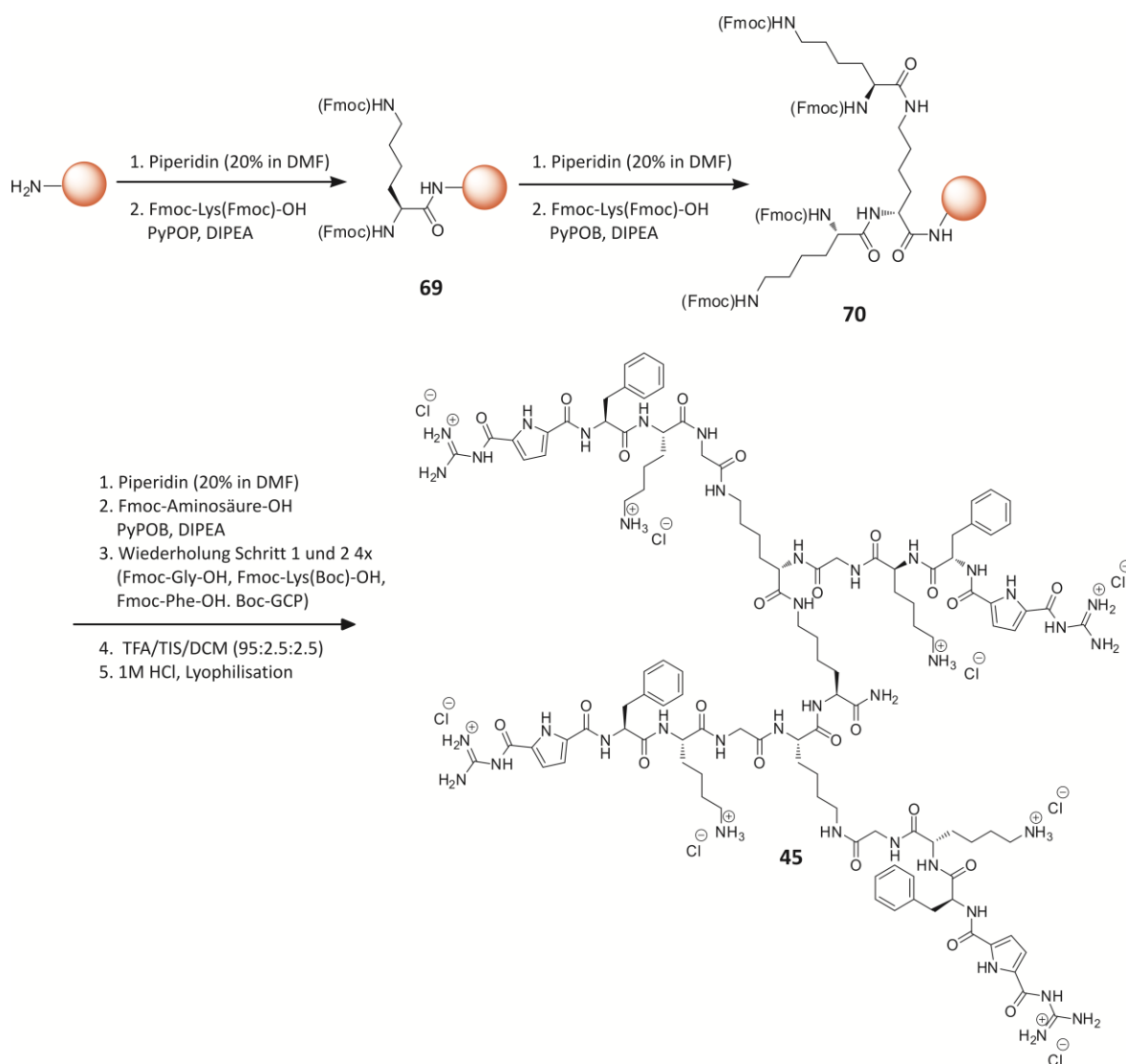
Die Festphasenpeptidsynthese von **61** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde das *Rink Amid* MBHA-Harz zunächst für 2 Stunden in 10 mL DCM quellen gelassen und danach 2 Mal mit DMF gewaschen (je 5 mL). Nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) wurde die erste Aminosäure Fmoc-Lysin(Alloc)-OH an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt, um den Aufbau der dreiararmigen Verbindung zu ermöglichen. Dafür wurde zunächst die Seitenkette von Lysin Alloc-entschützt mit einer Mischung aus  $\text{PhSiH}_3$  und  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in 10 mL DCM (20 Min). Diese Prozedur wurde wiederholt und das Harz anschließend erst 3× mit DCM und 3× mit DMF (je 5 mL, 5 Min) gewaschen. Dann wurde das zweifach Fmoc-geschützte Lysin an die Seitenkette gekuppelt. Nach der darauffolgenden Fmoc-Entschützung waren so drei freie Amine vorhanden und die Aminosäuren Glycin, Phenylalanin und Lysin sowie das Bindungsmotiv GCP wurden jeweils mit 2 Äq. pro Arm an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 25 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 375 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach vier RP-Gradienten-MPLC-Läufen (A 375 mg: 40–70 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 70–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; B 140 mg: 46–56 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 56–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; C 90 mg: 44–50 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 55–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; D 20 mg: 44–50 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 55–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min) konnten 5 mg eines weißen voluminösen Feststoffs erhalten werden. Zum Umsaltzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (3×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**$\text{C}_{84}\text{H}_{123}\text{Cl}_6\text{N}_{29}\text{O}_{17}$**     2023.78  $\text{g mol}^{-1}$

**Ausbeute**            Rohprodukt (TFA-Salz): 375 g, 0.16 mmol, 65 %, Produkt (HCl-Salz): 3 mg, 0.001 mmol, <1 %

**HPLC**                (RP18) 35–65 % MeOH+0.05 % TFA in 35 Min,  $R_f$  = 9.6 Min, >90 %

**HR-MS**             (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{84}\text{H}_{117}\text{N}_{29}\text{O}_{17}+2\text{H}]^{2+}$  903.4678  $\text{g mol}^{-1}$ , gefunden 903.4432  $\text{g mol}^{-1}$

7.3.2.6. (GCP-Phe-Lys-Gly)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (45)

Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.84	1	0.34	400	
PyBOP		4	1.34	699	
		8	2.69	1399	
DIPEA		5	1.68	217	293
		10	3.36	434	587
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	1.34	794	
Fmoc-Gly-OH		8	2.69	799	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		4	1.34	630	
Fmoc-Phe-OH		4	1.34	521	
Boc-GCP		4	1.34	534	

Die Festphasenpeptidsynthese von **45** erfolgte wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde das *Rink Amid* MBHA-Harz eingewogen. Nach 2 Stunden quellen in 10 mL DCM, 2× waschen mit DMF (je 5 mL) wurde nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) die erste zweifach Fmoc-geschützte Aminosäure Lysin (4 Äq.) an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt. Für den Erhalt 4-armiger Verbindungen wurden dann nochmals Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (4 Äq.) sowohl an die Seitenkette als auch die Hauptkette gekuppelt. Die Aminosäure Glycin (8 Äq.) wurde anschließend als erste Seitenkettenamino­säure an die vier Arme gekuppelt. Daraufhin erfolgte eine Separation von ca. 150 mg des Harzes in ein zweites Reaktionsgefäß, in dem Verbindung **62** weiter aufgebaut wurde. Die übrigen ca 250 mg des Harzes wurden mit Lysin, Phenylalanin und der GCP-Baustein (je 4 Äq.) jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung und vollständigen Entschützung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 × mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 20 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 497 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach drei RP-Gradienten-MPLC-Läufen (A 497 mg: 40–60 % MeOH+0.05 % TFA in 38 Min, 60–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; B1 174 mg: 42–48 % MeOH+0.05 % TFA in 45 Min, 48–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; B2 44 mg: 35–55 % MeOH+0.05 % TFA in 35 Min, 55–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min) konnten 69 mg eines weißen voluminösen Feststoffs erhalten werden. Zum Umsalzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (5×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>114</sub>H<sub>167</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>39</sub>O<sub>23</sub>** 2735.42 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** Rohprodukt (TFA-Salz): 497 g, 0.15 mmol, 74 %, Produkt (HCl-Salz): 52 mg, 0.019 mmol, 9 %

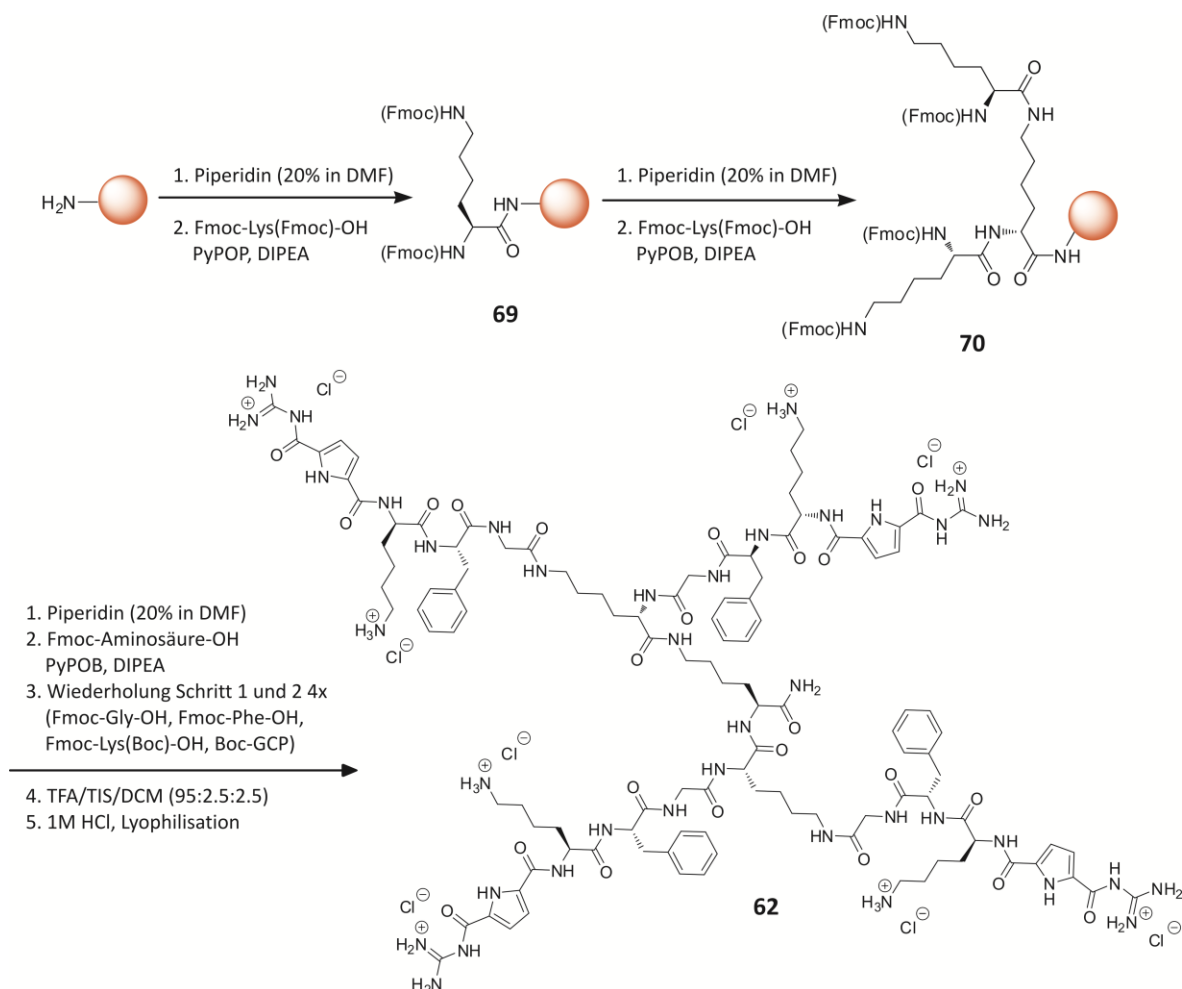
**HPLC** (RP18) 10–100 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min; R<sub>f</sub> = 17.8 Min, 220 nm >95 %

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 1.153–1.420 (m, 22H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.468–1.589 (m, 18H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.680–1.766 (m, 4H, Lys-CH<sub>2</sub>), 2.713–2.767 (m, 8H, Lys-εCH<sub>2</sub>), 2.883–2.927 (m, 4H, Phe-CH<sub>2</sub>), 2.927–3.011 (m, 6H, LysGrundgerüst-εCH<sub>2</sub>), 3.141–3.160 (m, 4H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.679–3.773 (m, 8H, Gly-αCH<sub>2</sub>), 4.086–4.210 (m, 2H, LysGrundgerüst-αCH), 4.227–4.313 (m, 5H, LysGrundgerüst-αCH, Lys-αCH), 4.739–4.806 (m, 4H, Phe-αCH), 6.859 (s br, 4H,

Pyrrol-CH), 7.129-7.178 (m, 4H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.214-7.265 (m, 8H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.304-7.349 (m, 9H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.496-7.530 (m, 4H, Pyrrol-CH, NH), 7.829 (s br, 12H, Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.955-8.021 (m, 4H, Lys-NH), 8.024-8.154 (m, 4H, Gly-NH), 8.384-8.494 (m, 10H, NH), 8.649 (s br, 6H, 3 Lys-NH, 3 NH), 8.762 (br s, 4H, Phe-NH), 12.043 (br s, 4H, NH), 12.438 (br s, 4H, Pyrrol-NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 22.109 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.163 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.624 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.760 (Lys-CH<sub>2</sub>), 22.869 (Lys-CH<sub>2</sub>), 26.469 (Lys-CH<sub>2</sub>), 28.739 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.110 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.227 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.444 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.806 (Lys-CH<sub>2</sub>), 31.906 (Lys-CH<sub>2</sub>), 37.202 (Phe-CH<sub>2</sub>), 38.441 (Lys-CH<sub>2</sub>), 38.540 (Lys-CH<sub>2</sub>), 41.911 (Gly-CH<sub>2</sub>), 52.555 (Lys-αCH), 54.252 (αCH), 54.307 (Phe-αCH), 113.380 (Pyrrol-CH), 115.774 (Pyrrol-CH), 125.646 (C<sub>q</sub>), 126.307 (CH), 128.086 (CH), 129.157 (CH), 132.144 (C<sub>q</sub>), 138.003 (C<sub>q</sub>), 155.476 (C<sub>q</sub>), 158.842 (C<sub>q</sub>), 159.701 (C<sub>q</sub>), 168.362 (C<sub>q</sub>), 168.481 (C<sub>q</sub>), 168.691 (C<sub>q</sub>), 171.208 (C<sub>q</sub>), 171.342 (C<sub>q</sub>), 171.391 (C<sub>q</sub>), 171.406 (C<sub>q</sub>), 171.538 (C<sub>q</sub>), 171.727 (C<sub>q</sub>), 171.783 (C<sub>q</sub>), 173.683 (C<sub>q</sub>) ppm

**HR-MS** (pos. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>114</sub>H<sub>159</sub>N<sub>39</sub>O<sub>23</sub>+3H]<sup>3+</sup> 815.0896 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 815.0786 g mol<sup>-1</sup>

7.3.2.7. (GCP-Lys-Phe-Gly)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (**62**)

Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.84	1	0.34	400	
PyBOP		4	1.34	699	
		8	2.69	1399	
DIPEA		5	1.68	217	293
		10	3.36	434	587
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	1.34	794	
Fmoc-Gly-OH		8	2.69	799	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		4	1.34	630	
Fmoc-Phe-OH		4	1.34	521	
Boc-GCP		4	1.34	534	

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Nach Aufbau des Grundgerüsts und Kupplung der ersten Aminosäure Glycin unter 7.3.2.6 erfolgte eine Separation von ca. 150 mg des Harzes in ein zweites Reaktionsgefäß, in dem Verbindung **62** weiter aufgebaut

wurde. Das Harz wurde mit Phenylalanin, Lysin und der GCP-Baustein (je 4 Äq.) jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung und vollständigen Entschützung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2× mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 20 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 281 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach MPLC (A 281 mg: 35–55 % MeOH+0.05 % TFA in 40 Min, 60–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; B 70 mg: 38–48 % MeOH+0.05 % TFA in 45 Min, 48–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 5 Min) konnten 31 mg ein weißer voluminöser Feststoff erhalten werden. Zum Umsaltzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (5×) wobei ein weißer kompakter Feststoff (24 mg) erhalten wurde.

**C<sub>114</sub>H<sub>167</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>39</sub>O<sub>23</sub>** 2735.42 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** Rohprodukt (TFA-Salz): 281 g, 0.087 mmol, 69 %, Produkt (HCl-Salz): 24 mg, 0.009 mmol, 7 %

**HPLC** (RP18) 10–100 % MeOH+0.05 % TFA in 30 min; R<sub>f</sub> = 16.5 minutes, >90 %

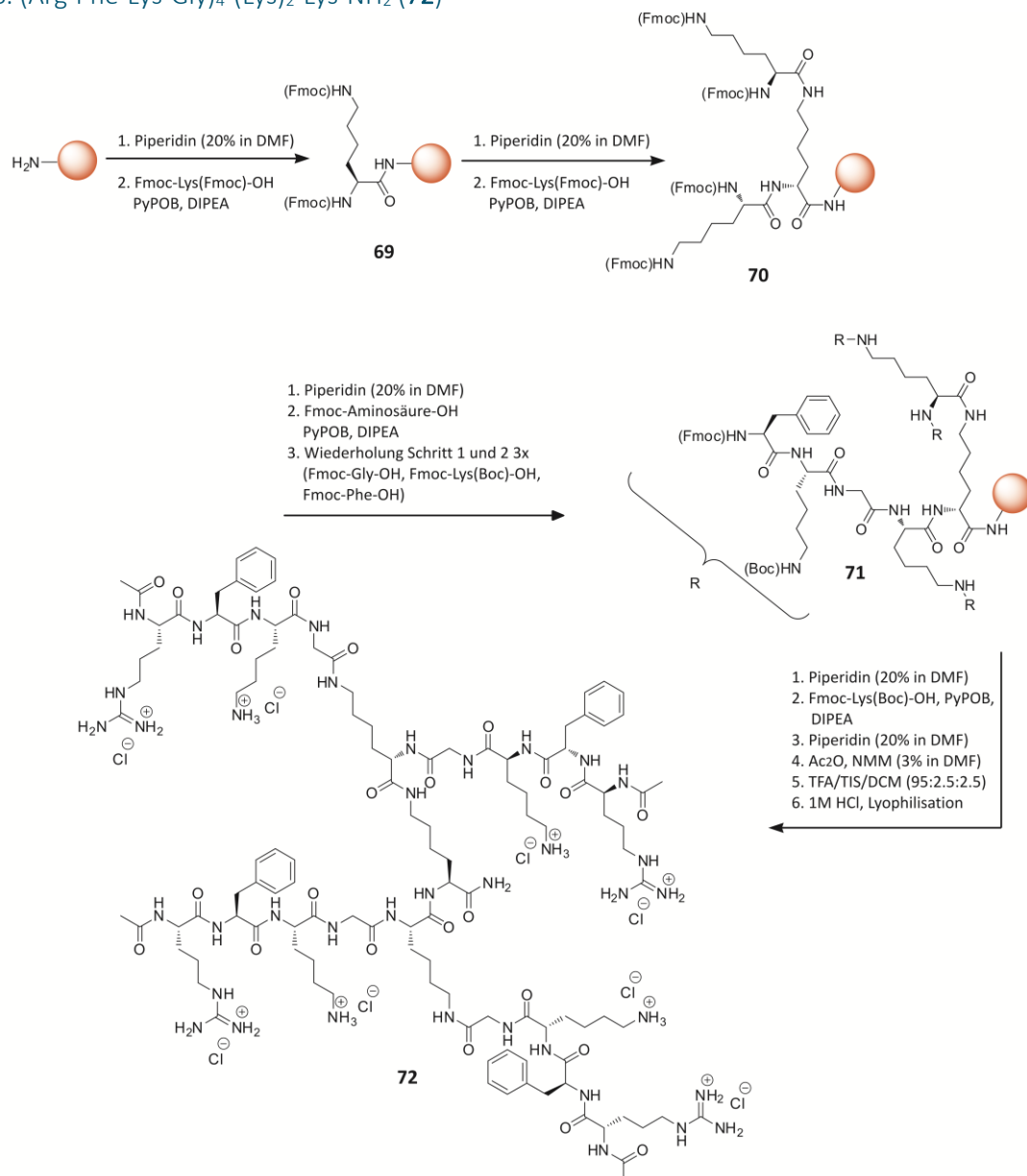
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 1.205–1.430 (m, 21H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.480–1.739 (m, 22H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.703–1.756 (m, 9H, Lys-εCH<sub>2</sub>), 2.713–2.767 (m, 4H, Phe-CH<sub>2</sub>), 2.927–3.011 (m, 11H, Lys-εCH<sub>2</sub>, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.659–3.803 (m, 8H, Gly-αCH<sub>2</sub>), 4.100–4.181 (m, 2H, Lys-αCH), 4.344–4.409 (m, 5H, Lys-αCH), 4.502–4.571 (m, 4H, Phe-αCH), 6.894–6.932 (m, 4H, Pyrrol-CH), 7.088–7.197 (m, 14H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.201–7.246 (m, 10H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.258–7.285 (m, 9H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.544–7.582 (m, 4H, Pyrrol-CH, NH), 7.788–7.863 (m, 15H, Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH), 7.937–8.084 (m, 5H, NH), 8.188–8.297 (m, 7H, Phe-NH, NH), 8.390–8.506 (m, 7H, Gly-NH NH), 8.564–8.728 (m, 12H, Lys-NH, NH), 12.019–12.087 (m, 4H, NH), 12.515–12.537 (m, 4H, Pyrrol-NH), 12.738 (br s, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 22.445 (CH<sub>2</sub>), 22.619 (CH<sub>2</sub>), 28.682 (CH<sub>2</sub>), 30.429 (CH<sub>2</sub>), 30.941 (CH<sub>2</sub>), 31.433 (CH<sub>2</sub>), 36.491 (CH<sub>2</sub>), 37.179 (CH<sub>2</sub>), 37.572 (CH<sub>2</sub>), 38.652 (CH<sub>2</sub>), 40.666 (CH<sub>2</sub>), 42.090 (CH<sub>2</sub>), 51.962 (CH), 52.306 (CH), 52.895 (CH), 53.407 (CH), 53.621 (CH), 53.975 (CH), 56.233 (CH), 113.630 (Pyrrol-CH), 115.801 (Pyrrol-CH), 125.620 (C<sub>q</sub>), 126.199 (CH), 126.447 (CH), 127.997 (CH), 128.142 (CH), 129.134 (C<sub>q</sub>),

129.279 ( $C_q$ ), 132.329 ( $C_q$ ), 132.355 ( $C_q$ ), 137.465 ( $C_q$ ), 137.710 ( $C_q$ ), 137.768 ( $C_q$ ),  
155.452 ( $C_q$ ), 155.512 ( $C_q$ ), 158.736 ( $C_q$ ), 158.948 ( $C_q$ ), 159.039 ( $C_q$ ), 159.115 ( $C_q$ ),  
159.735 ( $C_q$ ), 168.348 ( $C_q$ ), 168.484 ( $C_q$ ), 171.058 ( $C_q$ ), 171.118 ( $C_q$ ), 171.239 ( $C_q$ ),  
171.300 ( $C_q$ ), 171.481 ( $C_q$ ), 172.707 ( $C_q$ ), 173.479 ( $C_q$ ) ppm

**HR-MS** (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für  $[C_{114}H_{159}N_{39}O_{23}+3H]^{3+}$  815.0896  $\text{gmol}^{-1}$ , gefunden  
815.0795  $\text{gmol}^{-1}$



7.3.2.8. (Arg-Phe-Lys-Gly)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (**72**)

Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.33	1	0.21	644	
PyBOP		4	0.85	442	
		8	1.70	885	
DIPEA		5	1.44	137	186
		10	2.88	275	371
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	0.85	502	
Fmoc-Gly-OH		8	1.70	505	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		8	1.70	797	
Fmoc-Phe-OH		8	1.70	659	
Fmoc-Arg(Pbf)-OH		8	1.70	1103	

Die Festphasenpeptidsynthese von **72** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde *Rink Amid* MBHA-Harz mit einer geringeren Beladung, um eventuelle Nebenprodukte durch sterische Hinderung des verzweigten Peptidaufbaus zu verringern, eingewogen. Nach 2 Stunden quellen in 10 mL DCM und waschen mit DMF (2× je 5 mL) wurde nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) die erste zweifach Fmoc-geschützte Aminosäure Lysin (4 Äq.) an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt, um den Aufbau zwei weiterer Arme zu ermöglichen. Für den Erhalt 4-armiger Verbindungen wurden dann nochmals Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (4 Äq.) sowohl an die Seitenkette als auch die Hauptkette gekuppelt. Die Aminosäuren Glycin, Lysin, Phenylalanin und Arginin (je Äq.) wurden jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen an das Harz gekuppelt. Die End-Kappung erfolgte nach der letzten Fmoc-Entschützung vom zweiten Lysin mit 161 µL (8 Äq.) Ac<sub>2</sub>O in DMF mit 3 % NMM für 1 Stunde. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensivem Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung und vollständigen Entschützung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 25 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde erneut entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 550 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach MPLC (550 mg: 30–65 % MeOH+0.05 % TFA in 60 Min, 65–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 8 Min) konnten 136 mg eines weißen voluminösen Feststoffs erhalten werden. Zum Umsalzen wurden 26 mg des Feststoffs mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (5×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>118</sub>H<sub>199</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>39</sub>O<sub>23</sub>** 2815.71 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** Rohprodukt (TFA-Salz): 550 mg, 0.17 mmol, 78 %, Produkt (HCl-Salz): 20 mg, 0.007 mmol, 3 %; (TFA-Salz): 110 mg, 0.033 mmol, 16 %

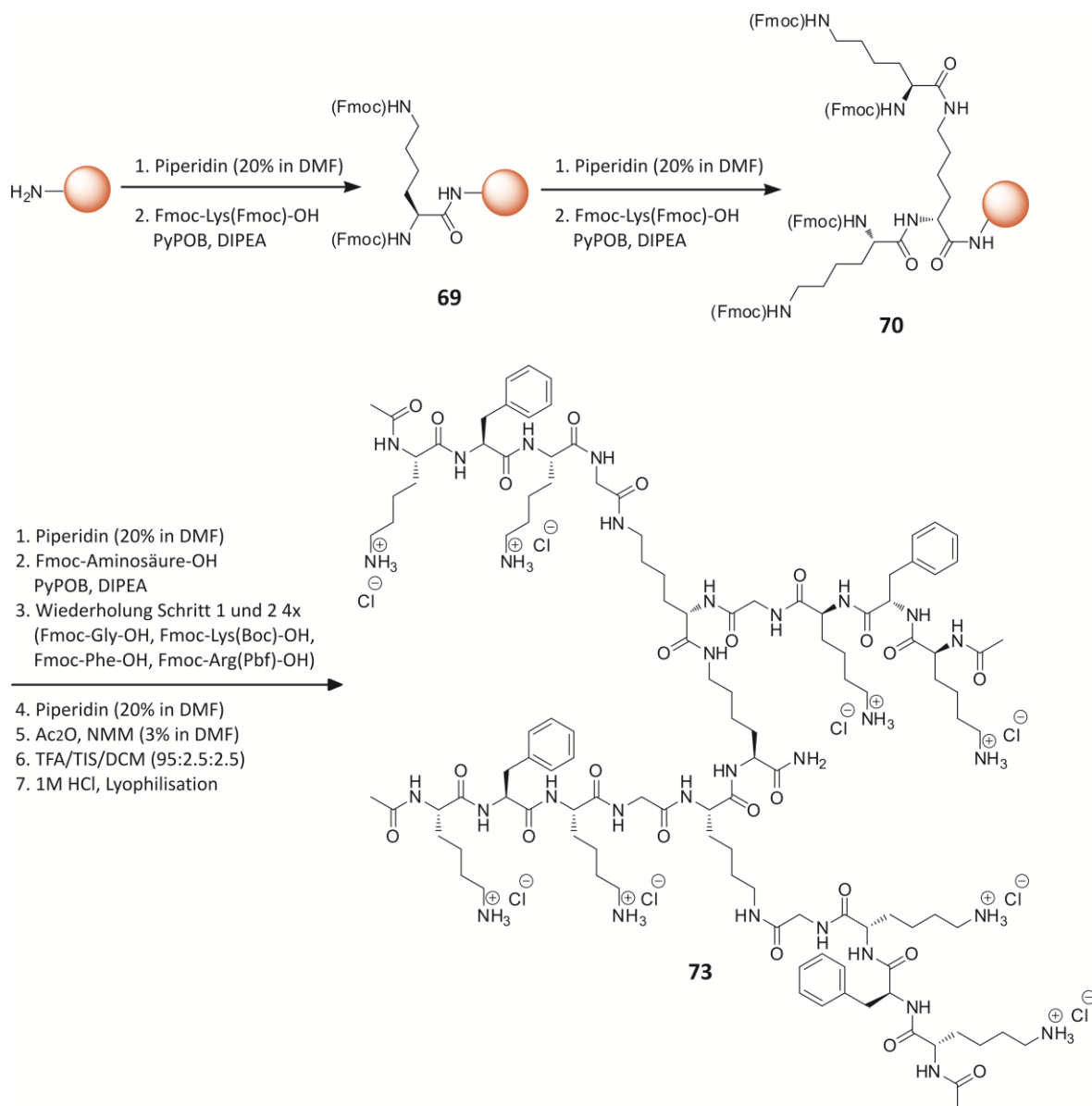
**HPLC** (RP18) 10–100 % MeOH+0.05 % TFA in 30 min; R<sub>f</sub> = 14.5 min, >90 %

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 1.109–1.410 (m, 36H, Arg-CH<sub>2</sub>, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.421–1.562 (m, 28H, Arg-CH<sub>2</sub>, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.590–1.709 (m, 8H, Arg-CH<sub>2</sub>, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.833 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 2.675–2.837 (m, 20H, Arg-δCH<sub>2</sub>, Lys-εCH<sub>2</sub>, Phe-CH<sub>2</sub>), 2.963–3.091 (m, 10H, Arg-δCH<sub>2</sub>, Lys-εCH<sub>2</sub>, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.665–3.792 (m, 8H, Gly-αCH<sub>2</sub>), 4.045–4.116 (m, 4H, Arg-αCH), 4.135–4.278 (m, 7H, Lys-Grundgerüst-αCH, Lys-αCH), 4.491–4.542 (m, 2H, Phe-αCH), 7.004 (s br, 1H, NH), 7.160–7.247 (m, 20H, Phe-CH<sub>ar</sub>), 7.273 (s br, 1H, NH), 7.675–

7.784 (m, 20H, Arg-NH<sub>gua</sub>), 7.813 (s, 3H, NH), 8.651-8.658 (m, 5H, NH), 7.867-7.899 (m, 4H, NH), 7.983-8.059 (m, 12H, Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 22.095 (CH<sub>2</sub>), 22.125 (CH<sub>3</sub>), 22.225 (CH<sub>2</sub>), 22.475 (CH<sub>2</sub>), 22.682 (CH<sub>2</sub>), 22.841 (CH<sub>2</sub>), 22.918 (CH<sub>2</sub>), 26.590 (CH<sub>2</sub>), 26.616 (CH<sub>2</sub>), 28.760 (CH<sub>2</sub>), 28.790 (CH<sub>2</sub>), 28.831 (CH<sub>2</sub>), 30.928 (CH<sub>2</sub>), 31.079 (CH<sub>2</sub>), 31.204 (CH<sub>2</sub>), 31.482 (CH<sub>2</sub>), 31.873 (CH<sub>2</sub>), 31.918 (CH<sub>2</sub>), 36.979 (CH<sub>2</sub>), 38.515 (CH<sub>2</sub>), 38.562 (CH<sub>2</sub>), 38.657 (CH<sub>2</sub>), 41.846 (CH<sub>2</sub>), 52.475 (CH), 52.505 (CH), 52.817 (CH), 52.852 (CH), 53.520 (CH), 114.224 (C<sub>q</sub>), 116.143 (C<sub>q</sub>), 118.129 (C<sub>q</sub>), 120.103 (C<sub>q</sub>), 126.216 (CH), 127.973 (CH), 129.212 (CH), 137.664 (C<sub>q</sub>), 157.789 (C<sub>q</sub>), 158.001 (C<sub>q</sub>), 158.195 (C<sub>q</sub>), 158.394 (C<sub>q</sub>), 168.325 (C<sub>q</sub>), 168.424 (C<sub>q</sub>), 168.622 (C<sub>q</sub>), 169.742 (C<sub>q</sub>), 170.955 (C<sub>q</sub>), 171.010 (C<sub>q</sub>), 171.218 (C<sub>q</sub>), 171.376 (C<sub>q</sub>), 171.495 (C<sub>q</sub>), 171.634 (C<sub>q</sub>), 171.698 (C<sub>q</sub>), 173.635 (C<sub>q</sub>) ppm

**HR-MS** (pos. ESI)  $m/z$  berechnet für [C<sub>118</sub>H<sub>191</sub>N<sub>39</sub>O<sub>23</sub>+6H]<sup>6+</sup> 421.5907 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 421.5908 g mol<sup>-1</sup>

7.3.2.9. (Lys-Phe-Lys-Gly)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (73)


Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.33	1	0.22	652	
PyBOP		4	0.86	448	
		8	1.72	896	
DIPEA		5	1.08	139	188
		10	2.15	278	376
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	0.86	508	
Fmoc-Gly-OH		8	1.72	512	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		8	1.72	806	
Fmoc-Phe-OH		8	1.72	667	

Die Festphasenpeptidsynthese von **73** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde das Harz, eingewogen. Nach 2 Stunden quellen in 10 mL DCM und waschen mit DMF (2× je 5 mL) wurde nach der ersten Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL) die erste zweifach Fmoc-geschützte Aminosäure Lysin (4 Äq.) an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt, um den Aufbau zwei weiterer Arme zu ermöglichen. Für den Erhalt 4-armiger Verbindungen wurden dann nochmals Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (4 Äq.) sowohl an die Seitenkette als auch die Hauptkette gekuppelt. Die Aminosäuren Glycin, Lysin, Phenylalanin und nochmal Lysin (je 8 Äq.) wurden jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen an das Harz gekuppelt. Die End-Kappung erfolgte nach der letzten Fmoc-Entschützung vom zweiten Lysin mit 163 µL (8 Äq.) Ac<sub>2</sub>O in DMF mit 3 % NMM für 1 Stunde. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit einer 9 : 1-Mischung aus TFA/DCM gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 20 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 497 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach MPLC (A 497 mg: 30–70 % MeOH+0.05 % TFA in 60 Min, 70–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 5 Min; B 211 mg: 30–50 % MeOH+0.05 % TFA in 60 Min, 50–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 5 Min) konnte ein weißer voluminöser Feststoff erhalten werden. Zum Umsalzen wurden die 41 mg Feststoffe mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (3×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>118</sub>H<sub>199</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>31</sub>O<sub>23</sub>** 2703.66 g mol<sup>-1</sup>

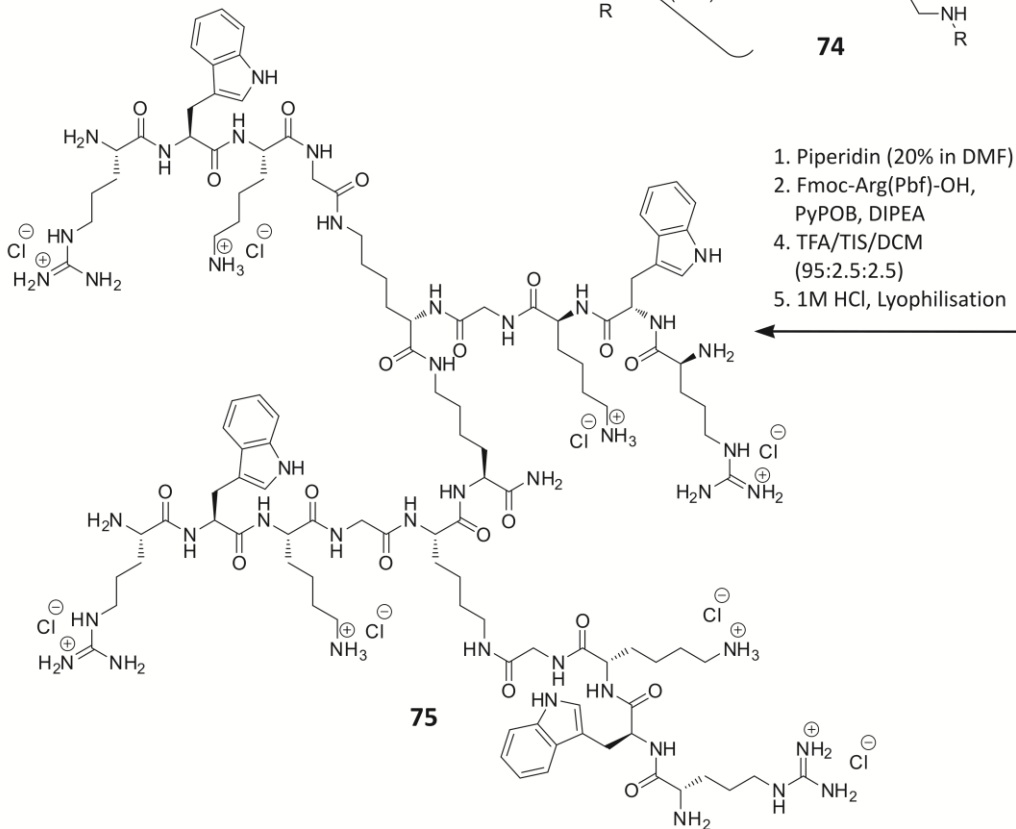
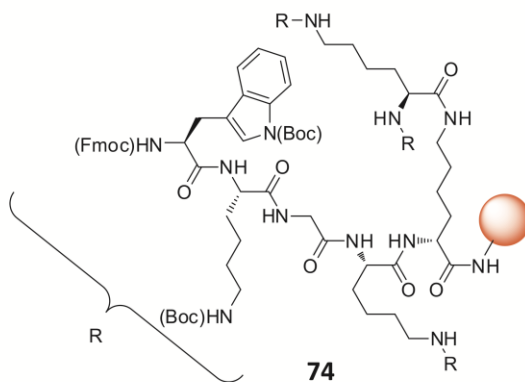
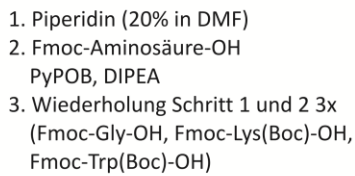
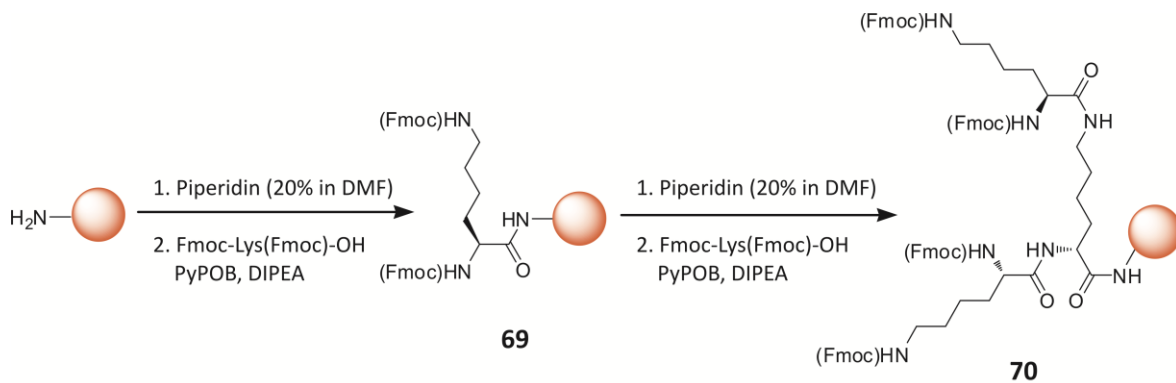
**Ausbeute** Rohprodukt (TFA-Salz): 497 g, 0.16 mmol, 72 %, Produkt (HCl-Salz): 35 mg, 0.019 mmol, 9 %

**HPLC** (RP18) 20–60 % MeOH+0.05 % TFA in 30 minutes R<sub>f</sub> = 15.7 minutes, >90 %

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 1.176–1.431 (m, 36H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.480–1.560 (m, 21H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.613–1.700 (m, 8H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.840 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 2.727–2.837 (m, 12H, Lys-εCH<sub>2</sub>, Phe-CH<sub>2</sub>), 2.970–3.085 (m, 18H, Lys<sub>Grundgerüst</sub>-εCH<sub>2</sub>, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.672–3.769 (m, 8H, Gly-αCH<sub>2</sub>), 4.130–4.216 (m, 11H, Lys<sub>Grundgerüst</sub>-αCH, Lys-αCH), 4.494–4.546 (m, 4H, Phe-αCH), 7.007 (s br, 6H, NH), 7.157–7.281 (m, 22H, Phe-CH<sub>ar</sub>, NH), 7.369 (s br, 13H, NH), 7.630 (m, 4H, NH), 7.751 (s br, 12H, Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.822 (s br, 3H, NH), 7.942 (m, 8H, 8 NH) 8.013 (s br, 12H, Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ppm.

<b><math>^{13}\text{C}</math>-NMR</b>	(150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ) $\delta$ = 22.087 ( $\text{CH}_2$ ), 22.449 ( $\text{CH}_3$ ), 22.680 ( $\text{CH}_2$ ), 22.827 ( $\text{CH}_2$ ), 22.915 ( $\text{CH}_2$ ), 24.838 ( $\text{CH}_2$ ), 26.571 ( $\text{CH}_2$ ), 28.630 ( $\text{CH}_2$ ), 28.761 ( $\text{CH}_2$ ), 31.107 ( $\text{CH}_2$ ), 31.853 ( $\text{CH}_2$ ), 37.031 ( $\text{CH}_2$ ), 38.507 ( $\text{CH}_2$ ), 38.655 ( $\text{CH}_2$ ), 39.499 ( $\text{CH}_2$ ), 40.346 ( $\text{CH}_2$ ), 41.870 ( $\text{CH}_2$ ), 52.509 ( $\text{CH}$ ), 53.603 ( $\text{CH}$ ), 116.204 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 118.188 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 120.177 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 126.211 ( $\text{CH}$ ), 127.980 ( $\text{CH}$ ), 129.189 ( $\text{CH}$ ), 137.585 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 156.702 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 158.206 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 158.411 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 168.353 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 169.775 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 170.999 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 171.433 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 171.543 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 171.748 ( $\text{C}_\text{q}$ ), 173.650 ( $\text{C}_\text{q}$ ) ppm.
<b>HR-MS</b>	(pos. ESI) $m/z$ berechnet für $[\text{C}_{118}\text{H}_{191}\text{N}_{31}\text{O}_{23}+4\text{H}]^{4+}$ 603.8762 $\text{g mol}^{-1}$ , gefunden 603.8773 $\text{g mol}^{-1}$

7.3.2.10. (Arg-Trp-Lys-Gly)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (**75**)



1. Piperidin (20% in DMF)
2. Fmoc-Arg(Pbf)-OH,  
PyPOB, DIPEA
4. TFA/TIS/DCM  
(95:2.5:2.5)
5. 1M HCl, Lyophilisation



Reagenz	Beladung [mmol g <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.84	1	0.17	200	
PyBOP		4	0.67	349	
		8	1.68	699	
DIPEA		5	1.44	109	80
		10	2.88	218	160
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	0.67	397	
Fmoc-Gly-OH		8	1.68	399	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		8	1.68	629	
Fmoc-Trp(Boc)-OH		8	1.68	707	
Fmoc-Arg(Pbf)-OH		8	1.68	872	

Die Festphasenpeptidsynthese von **75** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Unter Argonatmosphäre wurde *Rink Amid* MBHA-Harz eingewogen, in DCM quellen gelassen und nach Waschen mit DMF (2× je 5 mL) wurde, anschließend an die erste Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 % in DMF, 5 mL), die zweifach Fmoc-geschützte Aminosäure Lysin (4 Äq.) an das Harz mit PyBOP und DIPEA in DMF gekuppelt. Für den Erhalt 4-armiger Verbindungen wurden dann nochmals Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (4 Äq.) sowohl an die Seitenkette als auch die Hauptkette gekuppelt. Die Aminosäuren Glycin, Lysin, Tryptophan und Arginin (je 8 Äq.) wurden jeweils nach Fmoc-Entschützung unter analogen Bedingungen an das Harz gekuppelt. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschützung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser-Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung und vollständigen Entschützung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit TFA gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 25 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 347 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mit RP-MPLC (A 347 mg: 40–70 % MeOH+0.05 % TFA in 25 Min, 70–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 5 Min). Die danach erhaltenen 30 mg Rohprodukts wurden aufgeteilt und mittels semi-präparativer HPLC gereinigt. (A 11 mg semi-präparativ: isokratisch 30 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min erhalten wurden 2.3 mg Produktgemisch, daher wurde dies verworfen; B 19 mg semi-präparativ: isokratisch 42 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min) konnte ein weißer voluminöser Feststoff (10 mg) erhalten werden. Zum Umsaltzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (5×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>118</sub>H<sub>195</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>43</sub>O<sub>19</sub>** 2803.71 g mol<sup>-1</sup>

<b>Ausbeute</b>	Rohprodukt (TFA-Salz): 347 g, 0.10 mmol, 50 %, Produkt (HCl-Salz): 8.8 mg, 0.003 mmol, 2 %
<b>Schmelzpunkt</b>	220-222 °C
<b>HPLC</b>	(RP18) 30–40 % MeOH+0.05 % TFA in 20 Minuten; R <sub>f</sub> = 11.4 Minuten, >90 %
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO) δ = 1.02-1.91, 2.86-3.20 (m, 80 H, 12×Arg-CH <sub>2</sub> , 28× Lys-CH <sub>2</sub> ), 2.66-2.84 (m, 8 H, 4× Trp-CH <sub>2</sub> ), 3.44-4.52 (m, 23 H, 15× CH, 4 × Gly-CH <sub>2</sub> ), 6.80-7.49 (m, 20 × Trp-CH), 7.77-8.51 (m, 58 H, 16× NH, 9× NH <sub>2</sub> , 8× NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 8.76-9.12 (m, 6 H, 6× NH), 11.05 (s, 4 H, 4× Gua-NH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO) δ =20.1,20.9, 22.1, 22.5, 22.7, 23.6, 24.0, 26.3, 27.1, 28.6, 30.1, 31.2, 31.6, 38.1, 38.3, 38.4, 41.8, 41.9, 44.4 (bs, 48 C, 28× Lys-CH <sub>2</sub> , 12× Arg-CH <sub>2</sub> , 4× Trp-CH <sub>2</sub> , 4× Gly-CH <sub>2</sub> ), 51.7,51.8, 52.4, 52.5, 52.6 (bs, 15 C, 15× CH), 106.8, 127.1, 136.3 (s, 12 C, 12× Trp-C <sub>q</sub> ), 111.3, 118.3, 120.9, 124.9 (s, 20 C, 20× Trp-CH), 155.7, 157.0 (s, 4 C, 4× Arg-C <sub>q</sub> ), 165.6, 167.9, 168.4, 168.5, 168.9, 171.1, 171.3, 171.4, 173.7, 173.8, 177.2 (bs, 19 C, 19× CO-C <sub>q</sub> ) ppm
<b>HR-MS</b>	(pos. ESI) <i>m/z</i> berechnet für [C <sub>118</sub> H <sub>187</sub> N <sub>43</sub> O <sub>19</sub> +3H] <sup>3+</sup> 837.8402 g mol <sup>-1</sup> , gefunden 837.8335 g mol <sup>-1</sup>
<b>FT-IR</b>	$\tilde{\nu}$ = 3250 (νN-H <sub>indol</sub> ), 3053 (νN-H von -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 2971 (νC-H), 1644 (νC=O von -CO-NH-), 1531 (νN-H von -CO-NH-), 1456 (δC-H), 745 (νC-H <sub>aromat</sub> ) cm <sup>-1</sup>



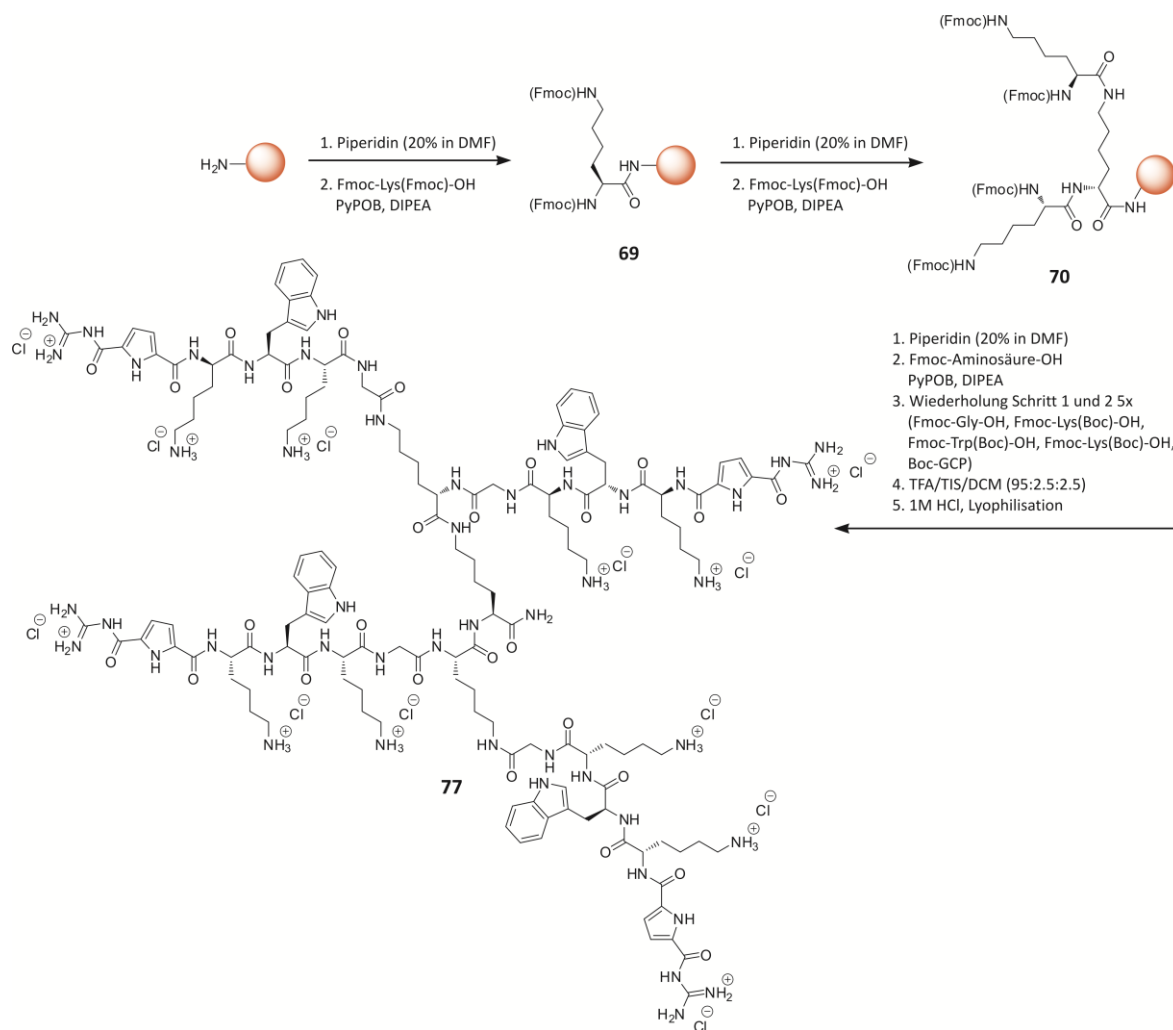
Die Festphasenpeptidsynthese von **76** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Das Harz wurde nach dem Quellen Fmoc-entschützt (Piperidin 20 % in DMF) und das Grundgerüst aufgebaut, indem erst Fmoc-Lys(Fmoc)-OH mit PyBOP und DIPEA gekuppelt wurden. Nach Fmoc-Entschätzung wurde dann nochmals zweifach Fmoc-geschütztes Lysin gekuppelt. Der Aufbau der Seitenarmsequenz erfolgte durch aufeinanderfolgende Kupplung von Glycin, Lysin, Tryptophan und des GCP-Bausteins. Jede Kupplung erfolgte zweifach. Entschätzung und Kupplungsschritte wurden mittels Kaiser Test überprüft. Nach intensiven Waschen mit DCM, MeOH und wieder DCM (je 3×5 mL, 5 Min) wurde das Harz bei 20 mbar eine Stunde getrocknet. Zur Abspaltung und vollständigen Entschätzung des Peptids wurde das Harz mit 10 mL einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5) für 3 Stunden versetzt. Nach Abnahme der Lösung wurde das Harz noch 2 Mal mit TFA gewaschen. Die aufgesammelten Lösungen wurden vereint und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der zähflüssige gelbe Rückstand wurde mit kaltem Diethylether versetzt, wobei ein weißlicher Feststoff ausfiel. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 25 000 rpm) wurde der Ether abgenommen, der Feststoff in frischen Ether resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Ether wurde wieder entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst und die Lösung lyophilisiert. Es wurden 302 mg gelblich-weißes Rohprodukt erhalten. Nach zwei MPLC Läufen (A 302 mg: 40–70 % MeOH+0.05 % TFA in 25 Min, 70–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 5 Min; B 59 mg: 50–60 % MeOH+0.05 % TFA in 25 Min, 70–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 5 Min) wurde eine dritte semi-präparative chromatografische Trennung durchgeführt (C semi-präparativ 42 % isokratisch). Es konnten 14 mg eines weißen, voluminösen Feststoffs erhalten werden. Zum Umsalzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (5×) wobei ein weißer kompakter Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>122</sub>H<sub>171</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>43</sub>O<sub>23</sub>** 2891.56 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** Rohprodukt (TFA-Salz): 302 g, 0.09 mmol, 74 %, Produkt (HCl-Salz): 6.3 mg, 0.003 mmol, 2 %

**HPLC** (RP18) 45–55 % MeOH+0.05 % TFA in 25 min; R<sub>f</sub> = 7.3 min, >95 %

**HR-MS** (pos. ESI) *m/z* berechnet für [C<sub>122</sub>H<sub>163</sub>N<sub>43</sub>O<sub>23</sub>+2H]<sup>2+</sup> 1300.6540 g mol<sup>-1</sup>, gefunden 1300.6805 g mol<sup>-1</sup>

7.3.2.12. (GCP-Lys-Trp-Lys-Gly)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (77)


Reagenz	Beladung [mmol <sup>-1</sup> ]	Äquivalente	n [mmol]	m [mg]	V [μL]
Harz	0.84	1	0.17	200	
PyBOP		4	0.67	350	
		8	1.34	699	
DIPEA		5	0.84	109	147
		10	1.68	218	293
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH		4	0.67	397	
Fmoc-Gly-OH		8	1.34	400	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		8	1.34	630	
Fmoc-Trp(Boc)-OH		8	1.34	708	
Boc-GCP		8	1.34	534	

Die Festphasenpeptidsynthese von **77** erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, wie unter 7.3.2.1 beschrieben. Nach zweistündigen Quellen des eingewogenen Harzes in DCM wurde die Fmoc-Schutzgruppe am Harz mit Piperidin (20 % in DMF) abgespalten und die erste Aminosäure Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (4 Äq.) mit dem Kupplungsreagenz PyBOP (4 Äq.) und der Hilfsbase DIPEA (5 eq) gekuppelt. Fmoc-Entschützung und Kuppeln der Aminosäuren wurde mittels Kaisertest überprüft. Das Lysin-Grundgerüst wurde mit doppelt Fmoc-geschützten Lysin (je 4 Äq.) aufgebaut. Für den Aufbau der Seitenarme wurden die Aminosäuren Lysin, Tryptophan und wieder Lysin (alle Boc-geschützt) und zuletzt Boc-GCP mit PyBOP (8 Äq.) und DIPEA (10 Äq.) gekuppelt. Alle Kupplungen erfolgten 2-fach. Nach intensiven Waschzyklus mit DCM, MeOH und DCM (je 3x5 Minuten) wurde das Peptid innerhalb von 3 Stunden vom Harz abgespalten unter Verwendung einer Mischung aus TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5). Nach zweimaligen Waschen mit TFA wurde die Lösung eingeeengt und mit kaltem Diethylether ein weiß-gelblicher Feststoff ausgefällt, der nach Abzentrifugieren (15 Minuten, 20 000 rpm) nochmaligen Resuspendieren in frischen Ether und wiederholten Zentrifugieren, in Wasser gelöst und anschließend lyophilisiert wurde. Es konnten 637 mg eines gelblichen Feststoffs erhalten werden. In drei Gradienten-RP-MPLC-Läufen wurde der Feststoff gereinigt. (A 637 mg: 35–40 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 40–50 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Min, 60–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; B 450 mg: 45–60 % MeOH+0.05 % TFA in 40 Min, 60–100 % MeOH+0.05 % TFA in 5 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min; C 46 mg: 35–50 % MeOH+0.05 % TFA in 40 Min, 50–100 % MeOH+0.05 % TFA in 2 Min, 100 % MeOH+0.05 % TFA für 10 Min). Es konnten 13 mg eines weißen voluminösen Feststoffs erhalten werden. Zum Umsaltzen wurde dieser Feststoff mit 0.1 M HCl versetzt und wiederholt lyophilisiert (4x) wobei ein weißer kompakter Feststoff (9 mg; 2 % Ausbeute) erhalten wurde.

**C<sub>146</sub>H<sub>223</sub>Cl<sub>12</sub>N<sub>51</sub>O<sub>27</sub>** 3550.09 g mol<sup>-1</sup>

<b>Ausbeute</b>	Rohprodukt (TFA-Salz): 637 mg, 0.15 mmol, 92 %, Produkt (HCl-Salz): 9 mg, 0.003 mmol, 2 %
<b>HPLC</b>	(RP18) 10–100 % MeOH+0.05 % TFA in 30 Minuten; R <sub>f</sub> = 14.9 min, 95 %
<b>HR-MS</b>	(pos. ESI) berechnet für [C <sub>146</sub> H <sub>211</sub> N <sub>51</sub> O <sub>27</sub> +3H] <sup>3+</sup> m/z = 1037.8975 g mol <sup>-1</sup> , gefunden m/z = 1037.8934 g mol <sup>-1</sup>

## 8. Literatur

---

- [1] Justus-Liebig Gesellschaft zu Gießen e. V., "[http://www.liebig-museum.de/justus\\_liebig/chemische\\_briefe/](http://www.liebig-museum.de/justus_liebig/chemische_briefe/)," abgerufen **2017**.
- [2] J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304–1319.
- [3] J.-M. Lehn, *Nobel Lect. Chem. 1981-1990* **1992**, 444.
- [4] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley And Sons, **2009**.
- [5] J. Černý, P. Hobza, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 5291.
- [6] J. Israelchvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, Oxford, **2011**.
- [7] P. Hobza, J. Řezáč, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 4911–4912.
- [8] P. Blondeau, M. Segura, R. Pérez-Fernández, J. de Mendoza, *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 198–210.
- [9] S. Balakrishnan, M. J. Scheuermann, N. J. Zondlo, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 259–270.
- [10] K. A. Schug, W. Lindner, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 67–114.
- [11] C. A. Fitch, G. Platzner, M. Okon, B. Garcia-Moreno E., L. P. McIntosh, *Protein Sci.* **2015**, *24*, 752–761.
- [12] B. P. Orner, A. D. Hamilton, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *41*, 141–147.
- [13] R. G. S. Berlinck, A. C. B. Burtoloso, M. H. Kossuga, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 919.
- [14] A. Melo, M. J. Ramos, W. B. Floriano, J. Gomes, J. F. R. Leao, A. L. Magalhaes, B. Maigret, M. C. Nascimento, N. Reuter, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, *463*, 81–90.
- [15] S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3648.
- [16] M. J. Langton, C. J. Serpell, P. D. Beer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1974–1987.
- [17] M. Meot-Ner (Mautner), *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 213–284.
- [18] M. Berger, F. P. Schmidtchen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9986–9993.
- [19] C. Schmuck, *Chem. Commun.* **1999**, 843–844.
- [20] C. Schmuck, *Chem Eur J* **2000**, *6*, 709–718.
- [21] J. L. Sessler, S. Camiolo, P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 17–55.
- [22] G. W. Bates, P. A. Gale, M. E. Light, *Chem Commun* **2007**, 2121–2123.
- [23] C. Caltagirone, J. R. Hiscock, M. B. Hursthouse, M. E. Light, P. A. Gale, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 10236–10243.
- [24] R. J. Fitzmaurice, F. Gaggini, N. Srinivasan, J. D. Kilburn, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1706.
- [25] C. Schmuck, U. Machon, *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11*, 1109–1118.
- [26] S.-Y. Chang, H. S. Kim, K.-J. Chang, K.-S. Jeong, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 181–184.
- [27] S. Niebling, S. K. Srivastava, C. Herrmann, P. R. Wich, C. Schmuck, S. Schlücker, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2133.

- [28] C. Schmuck, L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10486–10487.
- [29] C. Schmuck, T. Rehm, L. Geiger, M. Schäfer, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6162–6170.
- [30] C. Schmuck, L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8898–8899.
- [31] C. Schmuck, L. Hernandez-Folgado, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2390.
- [32] P. R. Wich, C. Schmuck, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4207–4210.
- [33] Q.-Q. Jiang, L. Bartsch, W. Sicking, P. R. Wich, D. Heider, D. Hoffmann, C. Schmuck, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1631.
- [34] Q.-Q. Jiang, W. Sicking, M. Ehlers, C. Schmuck, *Chem Sci* **2015**, *6*, 1792–1800.
- [35] H. Y. Kuchelmeister, C. Schmuck, *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 5311–5318.
- [36] K. Klemm, M. Radić Stojković, G. Horvat, V. Tomišić, I. Piantanida, C. Schmuck, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 1352–1363.
- [37] G. Drews, *Mikrobiologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**.
- [38] Q. C. Zhang, D. Petrey, L. Deng, L. Qiang, Y. Shi, C. A. Thu, B. Bisikirska, C. Lefebvre, D. Accili, T. Hunter, et al., *Nature* **2012**, *490*, 556–560.
- [39] M. P. Stumpf, T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart, H. J. An, M. Lappe, C. Wiuf, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 6959–6964.
- [40] E. A. Ponomarenko, E. V. Poverennaya, E. V. Ilgisonis, M. A. Pyatnitskiy, A. T. Kopylov, V. G. Zgoda, A. V. Lisitsa, A. I. Archakov, *Int. J. Anal. Chem.* **2016**, *2016*, 1–6.
- [41] L. M. Smith, N. L. Kelleher, M. Linial, D. Goodlett, P. Langridge-Smith, Y. Ah Goo, G. Safford, L. Bonilla\*, G. Kruppa, R. Zubarev, et al., *Nat. Methods* **2013**, *10*, 186–187.
- [42] E. L. Huttlin, L. Ting, R. J. Bruckner, F. Gebreab, M. P. Gygi, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, G. Colby, K. Baltier, et al., *Cell* **2015**, *162*, 425–440.
- [43] L. Bonetta, *Nature* **2010**, *468*, 851–854.
- [44] T. Rolland, M. Taşan, B. Charlotiaux, S. J. Pevzner, Q. Zhong, N. Sahni, S. Yi, I. Lemmens, C. Fontanillo, R. Mosca, et al., *Cell* **2014**, *159*, 1212–1226.
- [45] K. Venkatesan, J.-F. Rual, A. Vazquez, U. Stelzl, I. Lemmens, T. Hirozane-Kishikawa, T. Hao, M. Zenkner, X. Xin, K.-I. Goh, et al., *Nat. Methods* **2009**, *6*, 83–90.
- [46] M. P. Washburn, *Genome Biol.* **2016**, *17*, DOI 10.1186/s13059-016-0913-4.
- [47] P. Braun, A.-C. Gingras, *PROTEOMICS* **2012**, *12*, 1478–1498.
- [48] S. G. Hedin, *Biochem. J.* **1906**, *1*, 474.
- [49] L. L. Conte, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177–2198.
- [50] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317.
- [51] J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009.
- [52] F. B. Sheinerman, R. Norel, B. Honig, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 153–159.
- [53] J. R. Perkins, I. Diboun, B. H. Dessailly, J. G. Lees, C. Orengo, *Structure* **2010**, *18*, 1233–1243.
- [54] G. Schreiber, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 41–47.
- [55] G. Schreiber, G. Haran, H.-X. Zhou, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 839–860.
- [56] O. Keskin, A. Gursoy, B. Ma, R. Nussinov, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1225–1244.
- [57] C.-J. Tsai, S. L. Lin, H. J. Wolfson, R. Nussinov, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 53–64.
- [58] N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521–533.
- [59] W. Guo, J. A. Wisniewski, H. Ji, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2546–2554.
- [60] H. C. Jubb, A. P. Pandurangan, M. A. Turner, B. Ochoa-Montaño, T. L. Blundell, D. B. Ascher, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2016**, DOI 10.1016/j.pbiomolbio.2016.10.002.
- [61] Tom L. Blundell\*, David F. Burke, Dimitri Chirgadze, Venugopal Dhanaraj, Marko Hyvönen, C. Axel Innis, Emilio Parisini, Luca Pellegrini, Muhammed Sayed and, B. Lynn Sibanda, *Biol Chem* **2000**, 955–959.
- [62] I. Petta, S. Lievens, C. Libert, J. Tavernier, K. De Bosscher, *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 707–718.
- [63] H. Jubb, A. P. Higuieruelo, A. Winter, T. L. Blundell, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 241–248.
- [64] M. Vidal, M. E. Cusick, A.-L. Barabási, *Cell* **2011**, *144*, 986–998.
- [65] E. Klussmann, J. Scott, *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [66] M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1102–1114.



- [67] P. Buchwald, *IUBMB Life* **2010**, *62*, 724–731.
- [68] M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, T. N. Grossmann, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 9022–9054.
- [69] C. Sheng, G. Dong, Z. Miao, W. Zhang, W. Wang, *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 8238–8259.
- [70] F. Giordanetto, A. Schäfer, C. Ottmann, *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1812–1821.
- [71] P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2012–2018.
- [72] F. Giordanetto, A. Schäfer, C. Ottmann, *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1812–1821.
- [73] B. Zarzycka, M. A. Kuenemann, M. A. Miteva, G. A. F. Nicolaes, G. Vriend, O. Sperandio, *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 48–57.
- [74] D. Bier, P. Thiel, J. Briels, C. Ottmann, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2015**, *119*, 10–19.
- [75] L.-G. Milroy, T. N. Grossmann, S. Hennig, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4695–4748.
- [76] G. Fischer, M. Rossmann, M. Hyvönen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 78–85.
- [77] M. Raj, B. N. Bullock, P. S. Arora, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4051–4057.
- [78] T. Berg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2462–2481.
- [79] G. Zinzalla, D. Thurston, *Future Med Chem* **2009**, 65–93.
- [80] B. Cossins, A. Lawson, *Molecules* **2015**, *20*, 16435–16445.
- [81] N. London, B. Raveh, O. Schueler-Furman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 952–959.
- [82] L. Nevola, E. Giralt, *Chem Commun* **2015**, *51*, 3302–3315.
- [83] N. Bajwa, C. Liao, Z. Nikolovska-Coleska, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 37–55.
- [84] K. Balakrishnan, V. Gandhi, *Invest. New Drugs* **2013**, *31*, 1384–1394.
- [85] P. Mukherjee, P. Desai, Y.-D. Zhou, M. Avery, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 906–923.
- [86] M. Vogler, D. Dinsdale, M. J. Dyer, G. M. Cohen, *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 360–367.
- [87] A. Degterev, A. Lugovskoy, M. Cardone, B. Mulley, G. Wagner, T. Mitchison, J. Yuan, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 173–182.
- [88] J. D. Sadowsky, W. D. Fairlie, E. B. Hadley, H.-S. Lee, N. Umezawa, Z. Nikolovska-Coleska, S. Wang, D. C. S. Huang, Y. Tomita, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 139–154.
- [89] G. Wang, Z. Nikolovska-Coleska, C.-Y. Yang, R. Wang, G. Tang, J. Guo, S. Shangary, S. Qiu, W. Gao, D. Yang, et al., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6139–6142.
- [90] P. H. Bernardo, K.-F. Wan, T. Sivaraman, J. Xu, F. K. Moore, A. W. Hung, H. Y. K. Mok, V. C. Yu, C. L. L. Chai, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6699–6710.
- [91] M. Pinto, M. del Mar Orzaez, L. Delgado-Soler, J. J. Perez, J. Rubio-Martinez, *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1249–1258.
- [92] A. Friberg, D. Vigil, B. Zhao, R. N. Daniels, J. P. Burke, P. M. Garcia-Barrantes, D. Camper, B. A. Chauder, T. Lee, E. T. Olejniczak, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 15–30.
- [93] T. Oltersdorf, S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, et al., *Nature* **2005**, *435*, 677–681.
- [94] C. Tse, A. R. Shoemaker, J. Adickes, M. G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E. F. Johnson, K. C. Marsh, M. J. Mitten, P. Nimmer, et al., *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3421–3428.
- [95] R. Lock, H. Carol, P. J. Houghton, C. L. Morton, E. A. Kolb, R. Gorlick, C. P. Reynolds, J. M. Maris, S. T. Keir, J. Wu, et al., *Pediatr. Blood Cancer* **2008**, *50*, 1181–1189.
- [96] J. Chang, Y. Wang, L. Shao, R.-M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, K. Janakiraman, N. E. Sharpless, S. Ding, W. Feng, et al., *Nat. Med.* **2015**, *22*, 78–83.
- [97] A. J. Souers, J. D. Levenson, E. R. Boghaert, S. L. Ackler, N. D. Catron, J. Chen, B. D. Dayton, H. Ding, S. H. Enschede, W. J. Fairbrother, et al., *Nat. Med.* **2013**, *19*, 202–208.
- [98] red, *Im Focus Onkol.* **2016**, *19*, 73–73.
- [99] “CLL: FDA lässt ersten BCL 2-Inhibitor zu,” can be found under <http://mobile.aerzteblatt.de/news/66304.htm>, **2016**.
- [100] U. M. Moll, O. Petrenko, *Mol. Cancer Res.* **2003**, *1*, 1001–1008.
- [101] C. J. Brown, S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht, D. P. Lane, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 862–873.
- [102] D. W. Meek, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, DOI 10.1038/nrc2716.
- [103] M. Ljungman, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2929–2950.
- [104] A. J. Majmundar, W. J. Wong, M. C. Simon, *Mol. Cell* **2010**, *40*, 294–309.

- [105] X. Zhang, V. Mar, W. Zhou, L. Harrington, M. O. Robinson, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2388–2399.
- [106] L. T. Vassilev, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4491–4499.
- [107] J. Chen, V. Marechal, A. J. Levine, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 4107–4114.
- [108] P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, others, *Science* **1996**, *274*, 948.
- [109] L. T. Vassilev, *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*, 23–31.
- [110] P. Chène, *Mol. Cancer Res.* **2004**, *2*, 20–28.
- [111] J. K. Murray, S. H. Gellman, *Biopolymers* **2007**, *88*, 657–686.
- [112] A. Burgess, K. M. Chia, S. Haupt, D. Thomas, Y. Haupt, E. Lim, *Front. Oncol.* **2016**, *6*, DOI 10.3389/fonc.2016.00007.
- [113] I. R. Hardcastle, S. U. Ahmed, H. Atkins, G. Farnie, B. T. Golding, R. J. Griffin, S. Guyenne, C. Hutton, P. Källblad, S. J. Kemp, et al., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6209–6221.
- [114] O. Karni-Schmidt, M. Lokshin, C. Prives, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2016**, *11*, 617–644.
- [115] M. Liu, M. Pazgier, C. Li, W. Yuan, C. Li, W. Lu, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3731–3734.
- [116] L. T. Vassilev, *Science* **2004**, *303*, 844–848.
- [117] R. Villalonga-Planells, L. Coll-Mulet, F. Martínez-Soler, E. Castaño, J.-J. Acebes, P. Giménez-Bonafé, J. Gil, A. Tortosa, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18588.
- [118] B. Vu, P. Wovkulich, G. Pizzolato, A. Lovey, Q. Ding, N. Jiang, J.-J. Liu, C. Zhao, K. Glenn, Y. Wen, et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 466–469.
- [119] M. Andreeff, K. R. Kelly, K. Yee, S. Assouline, R. Strair, L. Popplewell, D. Bowen, G. Martinelli, M. W. Drummond, P. Vyas, et al., *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 868–876.
- [120] C. Iancu-Rubin, G. Mosoyan, K. Glenn, R. E. Gordon, G. L. Nichols, R. Hoffman, *Exp. Hematol.* **2014**, *42*, 137–145.e5.
- [121] A. Patnaik, A. Tolcher, M. Beeram, J. Nemunaitis, G. J. Weiss, K. Bhalla, M. Agrawal, G. Nichols, S. Middleton, A. Beryozkina, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *76*, 587–595.
- [122] I. Ray-Coquard, J.-Y. Blay, A. Italiano, A. Le Cesne, N. Penel, J. Zhi, F. Heil, R. Rueger, B. Graves, M. Ding, et al., *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 1133–1140.
- [123] Q. Ding, Z. Zhang, J.-J. Liu, N. Jiang, J. Zhang, T. M. Ross, X.-J. Chu, D. Bartkovitz, F. Podlaski, C. Janson, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5979–5983.
- [124] A. Lakoma, E. Barbieri, S. Agarwal, J. Jackson, Z. Chen, Y. Kim, M. McVay, J. M. Shohet, E. S. Kim, *Cell Death Discov.* **2015**, *1*, 15026.
- [125] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, G. Wang, S. Qiu, S. Shangary, W. Gao, D. Qin, J. Stuckey, K. Krajewski, et al., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3432–3435.
- [126] Y. Zhao, S. Yu, W. Sun, L. Liu, J. Lu, D. McEachern, S. Shargary, D. Bernard, X. Li, T. Zhao, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5553–5561.
- [127] B. Graves, T. Thompson, M. Xia, C. Janson, C. Lukacs, D. Deo, P. Di Lello, D. Fry, C. Garvie, K.-S. Huang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 11788–11793.
- [128] A. Barnard, J. A. Miles, G. M. Burslem, A. M. Barker, A. J. Wilson, *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 258–264.
- [129] M. J. Bowman, S. Byrne, J. Chmielewski, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 439–444.
- [130] A. Wlodawer, J. W. Erickson, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 543–585.
- [131] R. Zutshi, J. Franciskovich, M. Shultz, B. Schweitzer, P. Bishop, M. Wilson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4841–4845.
- [132] Z.-Y. Zhang, R. A. Poorman, L. L. Maggiora, R. L. Heinrikson, F. J. Kézdy, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15591–15594.
- [133] M. D. Shultz, Y.-W. Ham, S.-G. Lee, D. A. Davis, C. Brown, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9886–9887.
- [134] A. Weidemann, R. S. Johnson, *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 621–627.
- [135] D. L. Buckley, J. L. Gustafson, I. Van Molle, A. G. Roth, H. S. Tae, P. C. Gareiss, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11630–11634.
- [136] E. Miranda, I. K. Nordgren, A. L. Male, C. E. Lawrence, F. Hoakwie, F. Cuda, W. Court, K. R. Fox, P. A. Townsend, G. K. Packham, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10418–10425.

- [137] M. Parsanejad, Y. Zhang, D. Qu, I. Irrcher, M. W. C. Rousseaux, H. Aleyasin, F. Kamkar, S. Callaghan, R. S. Slack, T. W. Mak, et al., *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 8043–8050.
- [138] L. Fu, M. Tian, X. Li, J. Li, J. Huang, L. Ouyang, Y. Zhang, B. Liu, *Oncotarget* **2015**, *6*, 5501.
- [139] A. Chaidos, V. Caputo, A. Karadimitris, *Ther. Adv. Hematol.* **2015**, 2040620715576662.
- [140] E. Wadhwa, T. Nicolaides, *Cureus* **2016**, DOI 10.7759/cureus.620.
- [141] S. Knapp, P. Filippakopoulos, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 337–356.
- [142] E. Ferri, C. Petosa, C. E. McKenna, *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *106*, 1–18.
- [143] S. Alghamdi, I. Khan, N. Beeravolu, C. McKee, B. Thibodeau, G. Wilson, G. R. Chaudhry, *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, DOI 10.1186/s13287-016-0278-3.
- [144] J. E. Delmore, G. C. Issa, M. E. Lemieux, P. B. Rahl, J. Shi, H. M. Jacobs, E. Kastitis, T. Gilpatrick, R. M. Paranal, J. Qi, et al., *Cell* **2011**, *146*, 904–917.
- [145] R. Gosmini, V. L. Nguyen, J. Toum, C. Simon, J.-M. G. Brusq, G. Krysa, O. Mirguet, A. M. Riou-Eymard, E. V. Boursier, L. Trottet, et al., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8111–8131.
- [146] O. Mirguet, R. Gosmini, J. Toum, C. A. Clément, M. Barnathan, J.-M. Brusq, J. E. Mordaunt, R. M. Grimes, M. Crowe, O. Pineau, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7501–7515.
- [147] Y. Zhao, C.-Y. Yang, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7498–7500.
- [148] B. K. Albrecht, V. S. Gehling, M. C. Hewitt, R. G. Vaswani, A. Côté, Y. Leblanc, C. G. Nasveschuk, S. Bellon, L. Bergeron, R. Campbell, et al., *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1330–1339.
- [149] Geoffrey I. Shapiro, Afshin Dowlati, Patricia M. LoRusso, Joseph P. Eder, Adrienne Anderson, Khanh T. Do, Michael H. Kagey, Cynthia Sirard, James E. Bradner, Steven B. Landau, Boston, MA, **2015**.
- [150] M.-M. Coudé, T. Braun, J. Berrou, M. Dupont, S. Bertrand, A. Masse, E. Raffoux, R. Itzykson, M. Delord, M. E. Riveiro, et al., *Oncotarget* **2015**, *6*, 17698.
- [151] C. Berenguer-Daizé, L. Astorgues-Xerri, E. Odore, M. Cayol, E. Cvitkovic, K. Noel, M. Bekradda, S. MacKenzie, K. Rezai, F. Lokiec, et al., *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 2047–2055.
- [152] S. Picaud, C. Wells, I. Felletar, D. Brotherton, S. Martin, P. Savitsky, B. Diez-Dacal, M. Philpott, C. Bountra, H. Lingard, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 19754–19759.
- [153] R. Jahagirdar, H. Zhang, S. Azhar, J. Tobin, S. Attwell, R. Yu, J. Wu, K. G. McLure, H. C. Hansen, G. S. Wagner, et al., *Atherosclerosis* **2014**, *236*, 91–100.
- [154] D. Gilham, S. Wasiak, L. M. Tsujikawa, C. Halliday, K. Norek, R. G. Patel, E. Kulikowski, J. Johansson, M. Sweeney, N. C. W. Wong, *Atherosclerosis* **2016**, *247*, 48–57.
- [155] Xuesong Liu, Jun Li, Xin He, Matthew Stubbs, Margaret Favata, Xiaoming Wen, Hong Chang, Beth R. Rumberger, Yanlong Li, Thomas Maduskuie, Richard Sparks, Nikoo Falahatpisheh, Padmaja Polam, Andrew P. Combs, Reid Huber, Gregory Hollis, Peggy Scherle and Phillip C. Liu, in *Proc. 106th Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2015**.
- [156] Emily J. Faivre, Denise M. Wilcox, Paul Hessler, Tamar Uziel, Paul Tapang, Terry Magoc, Daniel H. Albert, Guowei Fang, Saul Rosenberg, Keith McDaniel, Keith McDaniel, Warren Kati and Yu Shen, in *Proc. 107th Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, Philadelphia, PA, **2016**.
- [157] David S Millan, Monica A Alvarez Morales, Kenneth J Barr, Daniel Cardillo, Alan Collis, Christopher J Dinsmore, Jaime A Escobedo, Kevin P Foley, Torsten Herbertz, Stephen Hubbs, Goss S Kauffman, Katherine J Kayser-Bricker, Mark T Kershaw, George P Luke, Matthew W Martin, Crystal McKinnon, Rachel L Mendes, Kristina R Muskiewicz, Shawn ER Schiller, Patricia Soulard, Adam C Talbot, Duncan Walker, Lili Yao, Grace L Williams, *Blood* **2015**, *126*, 1367.
- [158] E. von Schaper, *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 361–362.
- [159] H. F. Stähelin, *Experientia* **1996**, *52*, 5–13.
- [160] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler, H. Stähelin, *Agents Actions* **1976**, *6*, 468–475.
- [161] Q. Huai, H.-Y. Kim, Y. Liu, Y. Zhao, A. Mondragon, J. O. Liu, H. Ke, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 12037–12042.
- [162] T. Lazarova, Z. Weng, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 1327–1332.
- [163] N. A. Cliptone, G. R. Crabtree, *Nature* **1992**, 695.
- [164] F. Rusnak, P. Mertz, *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1483–1521.

- [165] J. P. Griffith, J. L. Kim, E. E. Kim, M. D. Sintchak, J. A. Thomson, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, P. R. Caron, K. Hsiao, M. A. Navia, *Cell* **1995**, 82, 507–522.
- [166] M. T. Goulet, K. M. Rupprecht, P. J. Sinclair, M. J. Wyvratt, W. H. Parsons, *Perspect. Drug Discov. Des.* **1994**, 2, 145–162.
- [167] S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Immunol. Today* **1992**, 13, 136–142.
- [168] S. Schreiber, *Cell* **1991**, 66, 807–815.
- [169] J. Choi, J. Chen, S. L. Schreiber, J. Clardy, *Science* **1996**, 239.
- [170] L. A. Banaszynski, C. W. Liu, T. J. Wandless, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4715–4721.
- [171] S. N. Sehgal, H. Baker, C. Vézina, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1975**, 28, 727–732.
- [172] D. Benjamin, M. Colombi, C. Moroni, M. N. Hall, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 868–880.
- [173] J. H. Bayle, J. S. Grimley, K. Stankunas, J. E. Gestwicki, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 99–107.
- [174] K. B. Seamon, W. Padgett, J. W. Daly, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78, 3363–3367.
- [175] G. Zhang, A. E. Ruoho, J. H. Hurley, *Nature* **1997**, 247.
- [176] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science* **1997**, 278, 1907–1916.
- [177] Y. Toya, C. Schwencke, Y. Ishikawa, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1998**, 30, 97–108.
- [178] C. Pinto, D. Papa, M. Hubner, T.-C. Mou, G. H. Lushington, R. Seifert, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 325, 27–36.
- [179] Y.-A. Chen, Y. Murakami, S. Ahmad, T. Yoshimaru, T. Katagiri, K. Mizuguchi, *BMC Res. Notes* **2014**, 7, 1.
- [180] R. Yamaji, R. Adamik, K. Takeda, A. Togawa, G. Pacheco-Rodriguez, V. J. Ferrans, J. Moss, M. Vaughan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 2567–2572.
- [181] J. Viaud, M. Zeghouf, H. Barelli, J.-C. Zeeh, A. Padilla, B. Guibert, P. Chardin, C. A. Royer, J. Cherfils, A. Chavanieu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 10370–10375.
- [182] “Pfizer’s Vyndaqel® (tafamidis) First Therapy Approved in the European Union for the Rare and Fatal Neurodegenerative Disease Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP),” can be found under <http://press.pfizer.com/press-release/pfizers-vyndaqel-tafamidis-first-therapy-approved-european-union-rare-and-fatal-neurod>, **2011**.
- [183] M. Waddington Cruz, M. D. Benson, *Neurol. Ther.* **2015**, 4, 61–79.
- [184] E. K. Roth, S. Hirtz, J. Duerr, D. Wenning, I. Eichler, H. H. Seydewitz, M. D. Amaral, M. A. Mall, *PLoS ONE* **2011**, 6, e24445.
- [185] ROBERT E. HANDSCHUMACHER, MATTHEW W. HARDING, JEFFREY RICE, RHETT J. DRUGGE, *Science* **1984**, 226, 544–547.
- [186] B. E. Bierer, P. S. Mattila, R. F. Standaert, L. A. Herzenberg, S. J. Burakoff, G. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, 87, 9231–9235.
- [187] N. Dharmasiri, S. Dharmasiri, M. Estelle, *Nature* **2005**, 435, 441–445.
- [188] B. Thines, L. Katsir, M. Melotto, Y. Niu, A. Mandaokar, G. Liu, K. Nomura, S. Y. He, G. A. Howe, J. Browse, *Nature* **2007**, 448, 661–665.
- [189] L. B. Sheard, X. Tan, H. Mao, J. Withers, G. Ben-Nissan, T. R. Hinds, Y. Kobayashi, F.-F. Hsu, M. Sharon, J. Browse, et al., *Nature* **2010**, 468, 400–405.
- [190] M. Zhang, J. M. Pascal, M. Schumann, R. S. Armen, J.-F. Zhang, *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1021.
- [191] S. W. Gerritz, C. Ciani, S. Kim, B. C. Pearce, C. Deminie, L. Discotto, B. McAuliffe, B. F. Minassian, S. Shi, S. Zhu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 15366–15371.
- [192] C. E. Bulawa, S. Connelly, M. DeVit, L. Wang, C. Weigel, J. A. Fleming, J. Packman, E. T. Powers, R. L. Wiseman, T. R. Foss, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 9629–9634.
- [193] T. Coelho, G. Merlini, C. E. Bulawa, J. A. Fleming, D. P. Judge, J. W. Kelly, M. S. Maurer, V. Planté-Bordeneuve, R. Labaudinière, R. Mundayat, et al., *Neurol. Ther.* **2016**, 5, 1–25.
- [194] B. B. Hasinoff, T. I. Kuschak, J. C. Yalowich, A. M. Creighton, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50, 953–958.
- [195] B. B. Hasinoff, M. E. Abram, N. Barnabé, T. Khélifa, W. P. Allan, J. C. Yalowich, *Mol. Pharmacol.* **2001**, 59, 453–461.



- [196] V. N. Malashkevich, N. G. Dulyaninova, U. A. Ramagopal, M. A. Liriano, K. M. Varney, D. Knight, M. Brenowitz, D. J. Weber, S. C. Almo, A. R. Bresnick, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 8605–8610.
- [197] S. C. Garrett, L. Hodgson, A. Rybin, A. Toutchkine, K. M. Hahn, D. S. Lawrence, A. R. Bresnick, *Biochemistry (Mosc.)* **2008**, *47*, 986–996.
- [198] B. E. Moore, V. J. Perez, *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, **1967**.
- [199] A. Aitken, *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 162–172.
- [200] A. Aitken, S. Howell, D. Jones, J. Madrazo, Y. Patel, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 5706–5709.
- [201] E. W. Wilker, R. A. Grant, S. C. Artim, M. B. Yaffe, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18891–18898.
- [202] M. B. Yaffe, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 53–57.
- [203] H. Fu, R. R. Subramanian, S. C. Masters, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 617–647.
- [204] T. Obsil, V. Obsilova, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 663–672.
- [205] A. Aitken, *Plant Molecular Biology* **2002**, *50*, 993–1010.
- [206] D. H. Jones, S. Ley, A. Aitken, *FEBS Lett.* **1995**, *368*, 55–58.
- [207] H. Hermeking, A. Benzinger, *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 183–192.
- [208] A. J. Muslin, J. W. Tanner, P. M. Allen, A. S. Shaw, *Cell* **1996**, *84*, 889–897.
- [209] M. B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, L. C. Cantley, *Cell* **1997**, *91*, 961–971.
- [210] S. Ganguly, J. L. Weller, A. Ho, P. Chemineau, B. Malpoux, D. C. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1222–1227.
- [211] B. Coblitz, M. Wu, S. Shikano, M. Li, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1531–1535.
- [212] C. Johnson, S. Crowther, M. J. Stafford, D. G. Campbell, R. Toth, C. MacKintosh, *Biochem. J.* **2010**, *427*, 69–78.
- [213] M. Würtele, C. Jelich-Ottmann, A. Wittinghofer, C. Oecking, *EMBO J.* **2003**, *22*, 987–994.
- [214] S. Rajan, R. Preisig-Müller, E. Wischmeyer, R. Nehring, P. J. Hanley, V. Renigunta, B. Musset, G. Schlichthörl, C. Derst, A. Karschin, et al., *J. Physiol.* **2002**, *545*, 13–26.
- [215] D. K. Morrison, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 16–23.
- [216] Y. Aghazadeh, V. Papadopoulos, *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 278–287.
- [217] G. Tzivion, V. S. Gupta, L. Kaplun, V. Balan, *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 203–213.
- [218] C. Mackintosh, *Biochem. J.* **2004**, *381*, 329–342.
- [219] D. W. Powell, M. J. Rane, B. A. Joughin, R. Kalmukova, J.-H. Hong, B. Tidor, W. L. Dean, W. M. Pierce, J. B. Klein, M. B. Yaffe, et al., *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 5376–5387.
- [220] J. M. Woodcock, J. Murphy, F. C. Stomski, M. C. Berndt, A. F. Lopez, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36323–36327.
- [221] J. Zhou, Z. Shao, R. Kerkela, H. Ichijo, A. J. Muslin, C. Pombo, T. Force, *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 4167–4176.
- [222] V. Obsilova, J. Silhan, E. Boura, J. Teisinger, T. Obsil, *Physiol. Res.* **2008**, *57*, S11.
- [223] V. Obsilova, M. Kopecka, D. Kosek, M. Kacirova, S. Kylarova, L. Rezabkova, T. Obsil, *Physiol. Res.* **2014**, *63*, S155.
- [224] J. Silhan, V. Obsilova, J. Vecer, P. Herman, M. Sulc, J. Teisinger, T. Obsil, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49113–49119.
- [225] G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich, *Biochemie & Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**.
- [226] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman, *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–149.
- [227] G. I. Evan, K. H. Vousden, *Nature* **2001**, *411*, 342–348.
- [228] J. Lee, A. Kumagai, W. G. Dunphy, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 551–563.
- [229] H. Hermeking, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 931–943.
- [230] P. R. Graves, C. M. Lovly, G. L. Uy, H. Piwnica-Worms, *Oncogene* **2001**, *20*, 1839.
- [231] A. Lopez-Girona, B. Furnari, O. Mondesert, P. Russell, *Nature* **1999**, *397*, 172–175.
- [232] Y. Sanchez, C. Wong, R. S. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnica-Worms, S. J. Elledge, *Science* **1997**, *277*, 1497–1501.

- [233] M. J. Waterman, E. S. Stavridi, J. L. Waterman, T. D. Halazonetis, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 175–178.
- [234] J. Q. Cheng, C. W. Lindsley, G. Z. Cheng, H. Yang, S. V. Nicosia, *Oncogene* **2005**, *24*, 7482–7492.
- [235] B. A. Hemmings, D. F. Restuccia, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a011189–a011189.
- [236] X. Zhang, N. Tang, T. J. Hadden, A. K. Rishi, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1978–1986.
- [237] T. Obsil, R. Ghirlando, D. E. Anderson, A. B. Hickman, F. Dyda, *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42*, 15264–15272.
- [238] G. Tzivion, M. Dobson, G. Ramakrishnan, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1938–1945.
- [239] Anne Brunet,\* Azad Bonni,\* Michael J. Zigmond,\*k, Michael Z. Lin,\* Peter Juo,† Linda S. Hu,\* Michael J. Anderson,‡ Karen C. Arden,‡ John Blenis,†, and Michael E. Greenberg\*§, *Cell* **n.d.**, *96*, 857–868.
- [240] J. Liang, J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M. K. Connor, K. Han, J.-H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos, R. Beniston, et al., *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1153–1160.
- [241] Z. Xiangshan, G. A. N. Lixia, P. A. N. Haiyun, K. A. N. Donghui, M. Majeski, T. G. UNTERMAN, others, *Biochem. J.* **2004**, *378*, 839–849.
- [242] S. R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, M. E. Greenberg, *Cell* **1997**, *91*, 231–241.
- [243] S. R. Datta, A. Katsov, L. Hu, A. Petros, S. W. Fesik, M. B. Yaffe, M. E. Greenberg, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 41–51.
- [244] J. Zha, H. Harada, E. Yang, J. Jockel, S. J. Korsmeyer, *Cell* **1996**, *87*, 619–628.
- [245] G. W. Porter, F. R. Khuri, H. Fu, *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 193–202.
- [246] C. Wellbrock, M. Karasarides, R. Marais, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 875–885.
- [247] D. Matallanas, M. Birtwistle, D. Romano, A. Zebisch, J. Rauch, A. von Kriegsheim, W. Kolch, *Genes Cancer* **2011**, *2*, 232–260.
- [248] D. Filchtinski, O. Sharabi, A. Rüppel, I. R. Vetter, C. Herrmann, J. M. Shifman, *J. Mol. Biol.* **2010**, *399*, 422–435.
- [249] H. R. Mott, J. W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R. M. Bell, S. L. Campbell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 8312–8317.
- [250] G. Hatzivassiliou, K. Song, I. Yen, B. J. Brandhuber, D. J. Anderson, R. Alvarado, M. J. C. Ludlam, D. Stokoe, S. L. Gloor, G. Vigers, et al., *Nature* **2010**, *464*, 431–435.
- [251] A. Fischer, A. Baljuls, J. Reinders, E. Nekhoroshkova, C. Sibilski, R. Metz, S. Albert, K. Rajalingam, M. Hekman, U. R. Rapp, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3183–3194.
- [252] A. S. Dhillon, S. Meikle, Z. Yazici, M. Eulitz, W. Kolch, *EMBO J.* **2002**, *21*, 64–71.
- [253] H. Chong, H. G. Vikis, K.-L. Guan, *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 463–469.
- [254] D. K. Morrison, G. Heidecker, U. R. Rapp, T. D. Copeland, *J Biol Chem* **1993**, *23*, 17309–17316.
- [255] M. Hekman, S. Wiese, R. Metz, S. Albert, J. Troppmair, J. Nickel, M. Sendtner, U. R. Rapp, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14074–14086.
- [256] M. Kubicek, M. Pacher, D. Abraham, K. Podar, M. Eulitz, M. Baccarini, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7913–7919.
- [257] N. Dumaz, R. Marais, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29819–29823.
- [258] M. Molzan, Charakterisierung Und Stabilisierung von 14-3-3-Protein-Protein-Wechselwirkungen, Technische Universität Dortmund, **2012**.
- [259] M. Molzan, C. Ottmann, *J. Mol. Biol.* **2012**, *423*, 486–495.
- [260] P. J. Roberts, C. J. Der, *Oncogene* **2007**, *26*, 3291–3310.
- [261] M. Beeram, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 6771–6790.
- [262] K. Terai, M. Matsuda, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 251–255.
- [263] D. Chen, S. B. Waters, K. H. Holt, J. E. Pessin, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6328–6332.
- [264] T. Raabe, U. R. Rapp, *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R635–R637.
- [265] S. D. Emerson, V. S. Madison, R. E. Palermo, D. S. Waugh, J. E. Scheffler, K.-L. Tsao, S. E. Kiefer, S. P. Liu, D. C. Fry, *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34*, 6911–6918.

- [266] L. K. Rushworth, A. D. Hindley, E. O'Neill, W. Kolch, *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2262–2272.
- [267] B. Diaz, D. Barnard, A. Filson, S. MacDonald, A. King, M. Marshall, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 4509–4516.
- [268] M. L. Edin, R. L. Juliano, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 4466–4475.
- [269] A. von Kriegsheim, A. Pitt, G. J. Grindlay, W. Kolch, A. S. Dhillon, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1011–1016.
- [270] J.-Z. Wang, F. Liu, *Prog. Neurobiol.* **2008**, *85*, 148–175.
- [271] Luc Buee, Patrick R. Hof, Thierry Bussie, Valerie Buee-Scherrerr, Andre Delacourtea, *Brain Res. Rev.* **2000**, *33*, 95–130.
- [272] R. Brandt, J. Léger, G. Lee, *J. Cell Biol.* **1995**, *131*, 1327–1340.
- [273] G. Lee, R. Neve, K. Kosik, *Neuron* **1989**, *2*, 1615–1624.
- [274] E. Nogales, *Trans Aime* **2000**, 277–302.
- [275] J.-Z. Wang, Z.-H. Wang, Q. Tian, *Neurosci. Bull.* **2014**, *30*, 359–366.
- [276] J. Avila, J. S. Jiménez, C. L. Sayas, M. Bolós, J. C. Zabala, G. Rivas, F. Hernández, *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8*, DOI 10.3389/fnagi.2016.00262.
- [277] M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000034.
- [278] H.-L. Li, H.-H. Wang, S.-J. Liu, Y.-Q. Deng, Y.-J. Zhang, Q. Tian, X.-C. Wang, X.-Q. Chen, Y. Yang, J.-Y. Zhang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 3591–3596.
- [279] J.-Z. Wang, Z.-H. Wang, *Exp. Gerontol.* **2015**, *68*, 82–86.
- [280] A. del C. Alonso, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 5562–5566.
- [281] G. Sadik, T. Tanaka, K. Kato, H. Yamamori, B. N. Nessa, T. Morihara, M. Takeda, *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 33–43.
- [282] H. Y. Qureshi, T. Li, R. MacDonald, C. M. Cho, N. Leclerc, H. K. Paudel, *Biochemistry (Mosc.)* **2013**, *52*, 6445–6455.
- [283] C. M. Wischik, R. A. Crowther, M. Stewart, M. Roth, *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1905–1912.
- [284] C. M. Wischik, M. Novak, P. C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, R. A. Crowther, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 4884–4888.
- [285] J. Avila, *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 361–384.
- [286] R. A. Crowther, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 2288–2292.
- [287] K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 783–793.
- [288] M. Goedert, *Trends Neurosci.* **1993**, *16*, 460–465.
- [289] R. Layfield, J. Fergusson, A. Aitken, S. Lowe, M. Landon, R. J. Mayer, *Neurosci. Lett.* **1996**, *209*, 57–60.
- [290] Y. Joo, B. Schumacher, I. Landrieu, M. Bartel, C. Smet-Nocca, A. Jang, H. S. Choi, N. L. Jeon, K.-A. Chang, H.-S. Kim, et al., *FASEB J.* **2015**, *29*, 4133–4144.
- [291] S. J. Clokie, K. Y. Cheung, S. Mackie, R. Marquez, A. H. Peden, A. Aitken, *FEBS J.* **2005**, *272*, 3767–3776.
- [292] J. Zhao, C. L. Meyerkord, Y. Du, F. R. Khuri, H. Fu, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 705–712.
- [293] C. D. Morrison, W. P. Schiemann, *Breast Cancer Res.* **2015**, *17*, DOI 10.1186/s13058-015-0603-2.
- [294] L.-G. Milroy, L. Brunsveld, C. Ottmann, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 27–35.
- [295] H. Hermeking, in *Semin. Cancer Biol.*, Academic Press, **2006**, p. 161.
- [296] C. Ottmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4058–4062.
- [297] A. Ballio, E. B. Chain, P. de Leo, B. F. Erlanger, M. Mauri, A. Tonolo, *Nature* **1964**, 297.
- [298] N. Turner, A. Graniti, *Nature* **1969**, 1070–1071.
- [299] C. Ottmann, S. Marco, N. Jaspert, C. Marcon, N. Schauer, M. Weyand, C. Vandermeeren, G. Duby, M. Boutry, A. Wittinghofer, et al., *Mol. Cell* **2007**, *25*, 427–440.
- [300] L. Camoni, S. Visconti, P. Aducci, *IUBMB Life* **2013**, *65*, 513–517.
- [301] R. Rose, S. Erdmann, S. Bovens, A. Wolf, M. Rose, S. Hennig, H. Waldmann, C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4129–4132.

- [302] A. Richter, R. Rose, C. Hedberg, H. Waldmann, C. Ottmann, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 6520–6527.
- [303] I. J. De Vries-van Leeuwen, D. da Costa Pereira, K. D. Flach, S. R. Piersma, C. Haase, D. Bier, Z. Yalcin, R. Michalides, K. A. Feenstra, C. R. Jimenez, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 8894–8899.
- [304] M. Zuzarte, K. Heusser, V. Renigunta, G. Schlichthörl, S. Rinné, E. Wischmeyer, J. Daut, B. Schwappach, R. Preisig-Müller, *J. Physiol.* **2009**, *587*, 929–952.
- [305] C. Anders, Y. Higuchi, K. Koschinsky, M. Bartel, B. Schumacher, P. Thiel, H. Nitta, R. Preisig-Müller, G. Schlichthörl, V. Renigunta, et al., *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 583–593.
- [306] L. Camoni, C. Di Lucente, S. Visconti, P. Aducci, *Biochem. J.* **2011**, *436*, 429–436.
- [307] M. Molzan, S. Kasper, L. Röglin, M. Skwarczynska, T. Sassa, T. Inoue, F. Breitenbuecher, J. Ohkanda, N. Kato, M. Schuler, et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1869–1875.
- [308] A. Horie, M. Akimoto, H. Tsumura, M. Makishima, T. Taketani, S. Yamaguchi, Y. Honma, *Leuk. Res.* **2008**, *32*, 1112–1123.
- [309] Y. Honma, *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1169–1178.
- [310] T. Kasukabe, J. Okabe-Kado, Y. Honma, *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1693–1698.
- [311] Y. Honma, T. Kasukabe, T. Yamori, N. Kato, T. Sassa, *Gynecol. Oncol.* **2005**, *99*, 680–688.
- [312] D. Bier, M. Bartel, K. Sies, S. Halbach, Y. Higuchi, Y. Haranosono, T. Brummer, N. Kato, C. Ottmann, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 911–918.
- [313] K. Mizuno, M. TSUJINO, M. TAKADA, M. HAYASHI, K. ATSUMI, K. ASANO, T. MATSUDA, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1974**, *27*, 775–782.
- [314] L. A. Turka, J. Dayton, G. Sinclair, C. B. Thompson, B. S. Mitchell, *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 940.
- [315] K. Tsuzuki, *Pediatr. Int.* **2002**, *44*, 224–231.
- [316] S. Yokota, *Pediatr. Int.* **2002**, *44*, 196–198.
- [317] S. Takahashi, H. Wakui, J.-Å. Gustafsson, J. Zilliacus, H. Itoh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 87–92.
- [318] L.-G. Milroy, M. Bartel, M. A. Henen, S. Leysen, J. M. C. Adriaans, L. Brunsveld, I. Landrieu, C. Ottmann, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15946–15950.
- [319] J. Zhao, Y. Du, J. R. Horton, A. K. Upadhyay, B. Lou, Y. Bai, X. Zhang, L. Du, M. Li, B. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 16212–16216.
- [320] L. Roglin, P. Thiel, O. Kohlbacher, C. Ottmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E1051–E1053.
- [321] H. Wu, J. Ge, S. Q. Yao, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6678–6682.
- [322] A. Arrendale, K. Kim, J. Y. Choi, W. Li, R. L. Geahlen, R. F. Borch, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 764–771.
- [323] Y. Takemoto, H. Watanabe, K. Uchida, K. Matsumura, K. Nakae, E. Tashiro, K. Shindo, T. Kitahara, M. Imoto, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1337–1347.
- [324] H. Kobayashi, Y. Ogura, M. Sawada, R. Nakayama, K. Takano, Y. Minato, Y. Takemoto, E. Tashiro, H. Watanabe, M. Imoto, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39259–39268.
- [325] M. Parri, P. Chiarugi, *Cell Commun. Signal.* **2010**, *8*, 23.
- [326] D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Angueta, S. Dutt, C. Wilch, F.-G. Klärner, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader, et al., *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 234–239.
- [327] O. Hantschel, G. Superti-Furga, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 33–44.
- [328] M. Mancini, N. Veljkovic, V. Corradi, E. Zuffa, P. Corrado, E. Pagnotta, G. Martinelli, E. Barbieri, M. A. Santucci, *Traffic* **2009**, *10*, 637–647.
- [329] K. Yoshida, T. Yamaguchi, T. Natsume, D. Kufe, Y. Miki, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 278–285.
- [330] A. M. Pendergast, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 213–214.
- [331] V. Corradi, M. Mancini, M. A. Santucci, T. Carlomagno, D. Sanfelice, M. Mori, G. Vignaroli, F. Falchi, F. Manetti, M. Radi, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6867–6871.
- [332] M. Mancini, E. Leo, K.-I. Takemaru, V. Campi, F. Castagnetti, S. Soverini, C. De Benedittis, G. Rosti, M. Cavo, M. A. Santucci, et al., *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0131074.
- [333] D. Aristizábal-Corrales, S. Schwartz Jr, J. Cerón, *Worm* **2013**, *2*, e21834.



- [334] D. Valensin, Y. Cau, P. Calandro, G. Vignaroli, L. Dello Iacono, M. Chiariello, M. Mori, M. Botta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 894–898.
- [335] C. Ottmann, M. Weyand, T. Sassa, T. Inoue, N. Kato, A. Wittinghofer, C. Oecking, *J. Mol. Biol.* **2009**, 386, 913–919.
- [336] R. Dahm, *Dev. Biol.* **2005**, 278, 274–288.
- [337] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137.
- [338] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1953**, 18, 123–131.
- [339] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171.
- [340] A. Klug, *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 3–26.
- [341] M. H. Wilkins, *Science* **1963**, 140, 941–950.
- [342] J. D. Watson, *Science* **1963**, 140, 17–26.
- [343] S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 7336–7359.
- [344] M. W. Nirenberg, **1963**.
- [345] M. Nirenberg, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 46–54.
- [346] J. H. Matthaei, M. W. Nirenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, 47, 1580–1588.
- [347] H. G. Khorana, *Nobel Lect. Physiol. Med. 1963–1970* **1968**, 341–369.
- [348] R. W. Holley, *Nobel Lect. Mol. Biol. 1933* **1975**, 285–300.
- [349] F. S. Collins, M. Morgan, A. Patrinos, *Science* **2003**, 300, 286–290.
- [350] M. P. Sawicki, G. Samara, M. Hurwitz, E. Passaro, *Am. J. Surg.* **1993**, 165, 258–264.
- [351] S. F. Sheet, *US Dep. Energy Genome Program's Biol. Environ. Res. Inf. Syst. BERISCited 2010 July 28 Available Httpwww Ornl GovscitechresourcesHumanGenomefaqsnps Shtml* **2010**.
- [352] J. Harrow, A. Frankish, J. M. Gonzalez, E. Tapanari, M. Diekhans, F. Kokocinski, B. L. Aken, D. Barrell, A. Zadissa, S. Searle, et al., *Genome Res.* **2012**, 22, 1760–1774.
- [353] Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304–1351.
- [354] L. Naldini, *Nature* **2015**, 526, 351–360.
- [355] M. Collins, A. Thrasher, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, 282, 20143003.
- [356] M. K. Brenner, S. Gottschalk, A. M. Leen, J. F. Vera, *Lancet Oncol.* **2013**, 14, e447–e456.
- [357] T. Wirth, N. Parker, S. Ylä-Herttuala, *Gene* **2013**, 525, 162–169.
- [358] G. Verma, M. K. Mishra, **2016**.
- [359] C. Sheridan, *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29, 121–128.
- [360] “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide,” can be found under <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>, **2017**.
- [361] M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm, *Pharmakologie Und Toxikologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2016**.
- [362] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, 337, 816–821.
- [363] E. Oude Blenke, M. J. W. Evers, E. Mastrobattista, J. van der Oost, *J. Controlled Release* **2016**, 244, 139–148.
- [364] J. W. Sessions, C. S. Skousen, K. D. Price, B. W. Hanks, S. Hope, J. K. Alder, B. D. Jensen, *SpringerPlus* **2016**, 5, DOI 10.1186/s40064-016-3037-0.
- [365] K. Modra, S. Dai, H. Zhang, B. Shi, J. Bi, *Eng. Life Sci.* **2015**, 15, 489–498.
- [366] R. Narain, *Polymers and Nanoparticles for Gene Therapy*, Elsevier, Cambridge, **2016**.
- [367] K. Morris, S. W.-L. Chan, S. E. Jacobsen, B. T. Looney, *Science* **2004**, 305, 1289–1292.
- [368] V. Pector, J. Backmann, D. Maes, M. Vandenbranden, J.-M. Ruysschaert, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 29533–29538.
- [369] I. A. Khalil, *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 32–45.
- [370] S. Xiang, H. Tong, Q. Shi, J. C. Fernandes, T. Jin, K. Dai, X. Zhang, *J. Controlled Release* **2012**, 158, 371–378.
- [371] J. P. Lim, P. A. Gleeson, *Immunol. Cell Biol.* **2011**, 89, 836–843.
- [372] H. T. McMahon, E. Boucrot, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, 12, 517–533.
- [373] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem. J.* **2004**, 377, 159–169.
- [374] D. B. Thompson, R. Villaseñor, B. M. Dorr, M. Zerial, D. R. Liu, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 831–843.

- [375] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 220–228.
- [376] A. M. Funhoff, C. F. van Nostrum, G. A. Koning, N. M. Schuurmans-Nieuwenbroek, D. J. Crommelin, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 32–39.
- [377] T. Endoh, T. Ohtsuki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 704–709.
- [378] N. D. Sonawane, F. C. Szoka, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826–44831.
- [379] J.-P. Behr, *Chim. Int. J. Chem.* **1997**, *51*, 34–36.
- [380] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657–663.
- [381] J. A. St George, *Gene Ther.* **2003**, *10*, 1135–1141.
- [382] M. A. Kay, J. C. Glorioso, L. Naldini, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 33–40.
- [383] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259–302.
- [384] D. T. Curiel, *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*, Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston; Heidelberg; Lodond; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo, **2016**.
- [385] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, M. A. Kay, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 346–358.
- [386] “Vectors used in gene therapy clinical trials,” can be found under <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>, **2016**.
- [387] S. Pearson, H. Jia, K. Kandachi, *China Approves First Gene Therapy*, Nature Publishing Group, **2004**.
- [388] Z. Peng, *Hum. Gene Ther.* **2005**, *16*, 1016–1027.
- [389] J. P. Hughes, G. Alusi, Y. Wang, *J. Laryngol. Otol.* **2015**, *129*, 314–320.
- [390] S. Ylä-Herttuala, *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1831–1832.
- [391] *Glybera Alipogene Tiparvovec Zusammenfassung EPAR*, EMA, **2015**.
- [392] L. M. Bryant, D. M. Christopher, A. R. Giles, C. Hinderer, J. L. Rodriguez, J. B. Smith, E. A. Traxler, J. Tycko, A. P. Wojno, J. M. Wilson, *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **2013**, *24*, 55–64.
- [393] *European Medicines Agency Recommends First Gene Therapy for Approval*, EMA, **2012**.
- [394] B. L. Liu, M. Robinson, Z.-Q. Han, R. H. Branston, C. English, P. Reay, Y. McGrath, S. K. Thomas, M. Thornton, P. Bullock, et al., *Gene Ther.* **2003**, *10*, 292–303.
- [395] *Imlygic Talimogen Laherparepvec Zusammenfassung Des EPAR*, EMA, **2015**.
- [396] *Strimvelis Zusammenfassung EPAR*, EMA, **2016**.
- [397] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 27–34.
- [398] M. E. Davis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 128–131.
- [399] L. De Laporte, J. Cruz Rea, L. D. Shea, *Biomaterials* **2006**, *27*, 947–954.
- [400] D. J. Glover, H. J. Lipps, D. A. Jans, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 299–310.
- [401] N. P. Gabrielson, J. Cheng, *Biomaterials* **2010**, *31*, 9117–9127.
- [402] M. Ramamoorth, *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, DOI 10.7860/JCDR/2015/10443.5394.
- [403] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 149–160.
- [404] W. T. Godbey, M. A. Barry, P. Saggau, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 321–328.
- [405] A. von Harpe, H. Petersen, Y. Li, T. Kissel, *J. Controlled Release* **2000**, *69*, 309–322.
- [406] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 992–1009.
- [407] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *45*, 268–275.
- [408] T. Reschel, Č. Koňák, D. Oupický, L. W. Seymour, K. Ulbrich, *J. Controlled Release* **2002**, *81*, 201–217.
- [409] C. Tros de Ilarduya, Y. Sun, N. Düzgüneş, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 159–170.
- [410] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, T. Kissel, *J. Controlled Release* **2003**, *89*, 113–125.
- [411] J. Suh, H. J. Paik, B. Hwang, *Bioorganic Chem.* **1994**, *22*, 318–327.
- [412] W. T. Godbey, A. G. Mikos, *J. Controlled Release* **2001**, *72*, 115–125.
- [413] S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J. P. Behr, F. Zacchello, M. Scarpa, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1100–1106.
- [414] V. M. Guillem, S. F. Aliño, *Gene Ther. Mol. Biol.* **2004**, *8*, 369–384.
- [415] A. U. Bielinska, C. Chen, J. Johnson, J. R. Baker, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 843–850.

- [416] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132.
- [417] J. F. Kukowska-Latallo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia, J. R. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 4897–4902.
- [418] K. Samanta, P. Jana, S. Bäcker, S. Knauer, C. Schmuck, *Chem Commun* **2016**, *52*, 12446–12449.
- [419] D. A. Eppstein, P. L. Felgner, T. R. Gadek, G. H. Jones, R. B. Roman, *PNAS* **1987**, *84*, 7413–7417.
- [420] M. C. P. de Lima, S. Simoes, P. Pires, H. Faneca, N. Düzgüneş, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 277–294.
- [421] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109.
- [422] D. Matulis, I. Rouzina, V. A. Bloomfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7331–7342.
- [423] B. A. Clements, V. Incani, C. Kucharski, A. Lavasanifar, B. Ritchie, H. Uludağ, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4693–4704.
- [424] R. I. Zhdanov, O. V. Podobed, V. V. Vlassov, *Bioelectrochemistry* **2002**, *58*, 53–64.
- [425] L. Wasungu, D. Hoekstra, *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 255–264.
- [426] T. Ren, Y. K. Song, G. Zhang, D. Liu, *Gene Ther.* **2000**, *7*.
- [427] A. Kichler, W. Zauner, M. Ogris, E. Wagner, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 855–860.
- [428] R. Koynova, B. Tenchov, *Recent Pat. DNA Gene Seq.* **2011**, *5*, 8–27.
- [429] P. L. Felgner, Y. J. Tsai, L. Sukhu, C. J. Wheeler, M. Manthorpe, J. Marshall, S. H. Cheng, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *772*, 126–139.
- [430] P. Severino, M. Szymanski, M. Favaro, A. R. Azzoni, M. V. Chaud, M. H. A. Santana, A. M. Silva, E. B. Souto, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *66*, 78–82.
- [431] J.-P. Vigneron, N. Oudrhiri, M. Fauquet, L. Vergely, J.-C. Bradley, M. Basseville, P. Lehn, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 9682–9686.
- [432] Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35*, 5616–5623.
- [433] J. D. Ramsey, N. H. Flynn, *Pharmacol. Ther.* **2015**, *154*, 78–86.
- [434] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, others, *FASEB J.* **1998**, *12*, 67–77.
- [435] M. Rhee, P. Davis, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1233–1240.
- [436] N. A. Alhakamy, A. S. Nigatu, C. J. Berkland, J. D. Ramsey, *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 741–757.
- [437] N. A. Alhakamy, P. Dhar, C. J. Berkland, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1047–1057.
- [438] U. K. Laemmli, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, *72*, 4288–4292.
- [439] D. Y. Kwok, C. C. Coffin, C. P. Lollo, J. Jovenal, M. G. Banaszczuk, P. Mullen, A. Phillips, A. Amini, J. Fabrycki, R. M. Bartholomew, et al., *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gene Struct. Expr.* **1999**, *1444*, 171–190.
- [440] A. L. Parker, L. Eckley, S. Singh, J. A. Preece, L. Collins, J. W. Fabre, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 1331–1337.
- [441] A. Akinc, R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 503–508.
- [442] I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 663–700.
- [443] C. Plank, K. Mechtler, F. C. Szoka, E. Wagner, *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1437–1416.
- [444] D. Putnam, C. A. Gentry, D. W. Pack, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 1200–1205.
- [445] M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 510–517.
- [446] G. Liu, M. Molas, G. A. Grossmann, M. Pasumathy, J. C. Perales, M. J. Cooper, R. W. Hanson, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34379–34387.
- [447] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193.
- [448] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.
- [449] D. Derossi, A. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [450] T. Takeuchi, S. Futaki, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2016**, *64*, 1431–1437.
- [451] N. A. Alhakamy, C. J. Berkland, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 1940–1948.
- [452] D. J. Mitchell, L. Steinman, D. T. Kim, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Pept. Res.* **2000**, *56*, 318–325.
- [453] S. Ichimura, M. Zama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *49*, 840–847.
- [454] C. Plank, M. X. Tang, A. R. Wolfe, F. C. Szoka, *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 319–322.

- [455] A. Upadhyaya, P. C. Sangave, *J. Pept. Sci.* **2016**, 22, 647–659.
- [456] N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai, G. C. L. Wong, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 1806–1813.
- [457] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 13003–13008.
- [458] H. Koo, H. Kang, Y. Lee, *Bull Korean Chem Soc* **2009**, 30, 927.
- [459] A. Mann, G. Thakur, V. Shukla, A. K. Singh, R. Khanduri, R. Naik, Y. Jiang, N. Kalra, B. S. Dwarakanath, U. Langel, et al., *Mol. Pharm.* **2011**, 8, 1729–1741.
- [460] M. Oba, Y. Demizu, H. Yamashita, M. Kurihara, M. Tanaka, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 4911–4918.
- [461] M. Oba, T. Kato, K. Furukawa, M. Tanaka, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 19913.
- [462] M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 2941–2944.
- [463] M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 8800–8803.
- [464] H. Y. Kuchelmeister, S. Karczewski, A. Gutschmidt, S. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 14016–14020.
- [465] H. Y. Kuchelmeister, A. Gutschmidt, S. Tillmann, S. Knauer, C. Schmuck, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 996.
- [466] S. Junghänel, Struktur-Wirkungs-Beziehung Peptidischer Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden Zur Nicht-Viralen Gentransfektion – Ein Balanceakt Über Einen Hindernisparcours, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie» Organische Chemie, **2017**.
- [467] T. Wang, J. R. Upponi, V. P. Torchilin, *Int. J. Pharm.* **2012**, 427, 3–20.
- [468] R. S. Burke, S. H. Pun, *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 693–704.
- [469] Y. Zhang, A. Satterlee, L. Huang, *Mol. Ther.* **2012**, 20, 1298–1304.
- [470] S. Mishra, P. Webster, M. E. Davis, *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, 83, 97–111.
- [471] M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, E. Wagner, *Gene Ther.* **1999**, 6, 595–605.
- [472] K. Kunath, T. Merdan, O. Hegener, H. Häberlein, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2003**, 5, 588–599.
- [473] J. Kleeff, K. Fukahi, M. E. Lopez, H. Friess, M. W. Büchler, B. A. Sosnowski, M. Korc, *Cancer Gene Ther.* **2002**, 9, 522–532.
- [474] M. Ogris, E. Wagner, *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 479–485.
- [475] S. Kawakami, S. Fumoto, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, *Pharm. Res.* **2000**, 17, 306–313.
- [476] Y. Ping, Q. Hu, G. Tang, J. Li, *Biomaterials* **2013**, 34, 6482–6494.
- [477] P. Chan, M. Kurisawa, J. E. Chung, Y.-Y. Yang, *Biomaterials* **2007**, 28, 540–549.
- [478] C. P. Leamon, P. S. Low, *Drug Discov. Today* **2001**, 6, 44–51.
- [479] N. C. Bellocq, S. H. Pun, G. S. Jensen, M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14, 1122–1132.
- [480] P. Boissguérin, S. Deshayes, M. J. Gait, L. O'Donovan, C. Godfrey, C. A. Betts, M. J. A. Wood, B. Lebleu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 87, 52–67.
- [481] I. Nakase, G. Tanaka, S. Futaki, *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 855.
- [482] Z. Liu, Z. Zhang, C. Zhou, Y. Jiao, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 1144–1162.
- [483] V. Incani, E. Tunis, B. A. Clements, C. Olson, C. Kucharski, A. Lavasanifar, H. Uludag, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, 81A, 493–504.
- [484] D. Wang, A. S. Narang, M. Kotb, A. O. Gaber, D. D. Miller, S. W. Kim, R. I. Mahato, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1197–1207.
- [485] J. M. Benms, J.-S. Choi, R. I. Mahato, J.-S. Park, S. W. Kim, *Bioconjug. Chem.* **2000**, 11, 637–645.
- [486] B. Shi, H. Zhang, J. Bi, S. Dai, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, 119, 55–65.
- [487] P. Lönn, A. D. Kacsinta, X.-S. Cui, A. S. Hamil, M. Kaulich, K. Gogoi, S. F. Dowdy, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 32301.
- [488] M. A. Zanta, P. Belguise-Valladier, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 91–96.
- [489] R. Cartier, R. Reszka, *Gene Ther.* **2002**, 9, 157.
- [490] J. Luten, C. F. van Nostrum, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *J. Controlled Release* **2008**, 126, 97–110.
- [491] N. M. Moore, C. L. Sheppard, S. E. Sakiyama-Elbert, *Acta Biomater.* **2009**, 5, 854–864.



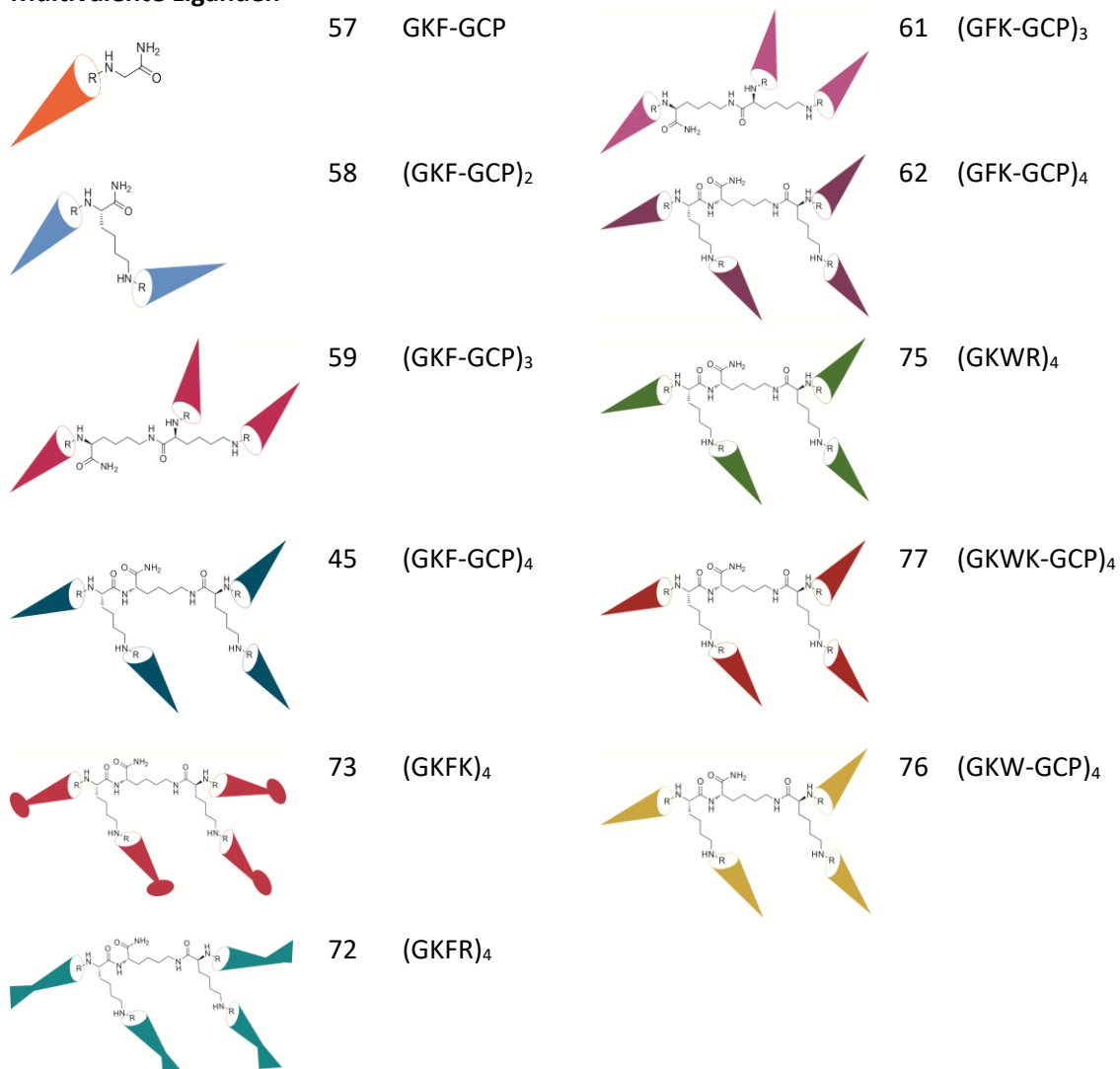
- [492] H.-Y. Wang, J.-X. Chen, Y.-X. Sun, J.-Z. Deng, C. Li, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *J. Controlled Release* **2011**, *155*, 26–33.
- [493] J. A. Wolff, D. B. Rozema, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 8–15.
- [494] R. B. Merrifield, *J Org Chem Soc* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [495] M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.
- [496] E. Kaiser, R. I. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [497] C. Loffredo, N. A. Assunção, J. Gerhardt, M. T. M. Miranda, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 808–817.
- [498] L. C. Dorman, *Tetrahedron Lett.* **1969**, *28*, 2319–2321.
- [499] F. Albericio, *Pept. Sci.* **2000**, *55*, 123–139.
- [500] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- [501] N. Thieriet, P. Gomez-Martinez, F. Guibé, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2505–2508.
- [502] O. Dangles, F. Guibe, G. Balavoine, S. Lavielle, A. Marquet, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4984–4993.
- [503] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787–3790.
- [504] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- [505] D. A. Pearson, M. Blanchette, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739–2742.
- [506] V. Martos, P. Castreño, J. Valero, J. de Mendoza, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 698–706.
- [507] A. Barnard, P. Posocco, S. Pricl, M. Calderon, R. Haag, M. E. Hwang, V. W. T. Shum, D. W. Pack, D. K. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20288–20300.
- [508] N. J. Moerke, in *Curr. Protoc. Chem. Biol.* (Eds.: A.P. Arkin, L. Mahal, F. Romesberg, K. Shah, C. Shamu, C. Thomas), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2009**.
- [509] Y. Du, *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 269–276.
- [510] D. M. Jameson, S. E. Seifried, *Methods* **1999**, *19*, 222–233.
- [511] Y. Yan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 635–640.
- [512] W. A. Lea, A. Simeonov, *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 17–32.
- [513] G. Weber, *Biochem. J.* **1952**, *51*, 145.
- [514] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2006**.
- [515] E. Terpetschnig, **2016**.
- [516] N. J. Moerke, in *Curr. Protoc. Chem. Biol.* (Eds.: A.P. Arkin, L. Mahal, F. Romesberg, K. Shah, C. Shamu, C. Thomas), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2009**.
- [517] C. Schmuck, L. Geiger, *Chem. Commun.* **2005**, 772.
- [518] N. J. V. Lindgren, L. Geiger, J. Razkin, C. Schmuck, L. Baltzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6722–6725.
- [519] C. Schmuck, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3053–3067.
- [520] S. K. Srivastava, S. Niebling, B. Küstner, P. R. Wich, C. Schmuck, S. Schlücker, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6770.
- [521] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlén, *ELECTROPHORESIS* **2005**, *26*, 501–510.
- [522] M. Bartel, Molecular Concepts for the Modulation of 14-3-3 Protein-Protein-Interactions, Technische Universität Eindhoven, **2015**.
- [523] D. Arzenšek, in *Semin. Dep. Phys. Univ. Ljubl.*, **2010**, pp. 1–18.
- [524] B. Lorber, F. Fischer, M. Bailly, H. Roy, D. Kern, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2012**, *40*, 372–382.
- [525] A. D. Hanlon, M. I. Larkin, R. M. Reddick, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 297–304.
- [526] R. Shaw, *Dynamic Light Scattering Training*, Malvern Instruments: Malvern, UK, **2014**.
- [527] W. I. Goldburg, *Am. J. Phys.* **1999**, *67*, 1152.
- [528] M. Sartor, *Univ. Calif. San Diego* **2003**, 2–21.
- [529] F. R. Hallett, *Food Res. Int.* **1994**, *27*, 195–198.
- [530] A. P. Schoen, N. Cordella, S. Mehraeen, M. A. Arunagirinathan, A. J. Spakowitz, S. C. Heilshorn, *Soft Matter* **2013**, *9*, 9137.
- [531] B. D. Hames, *Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford ; New York ; Tokyo, **1998**.
- [532] **2017**.
- [533] D.-H. Kang, Y.-S. Gho, M.-K. Suh, C.-H. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1511–1512.

- [534] J.-B. LePecq, C. Paoletti, *J Mol Biol* **1967**, 27, 87–106.
- [535] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 269–282.
- [536] A. Alonso, M. J. Almendral, Y. Curto, J. J. Criado, E. Rodríguez, J. L. Manzano, *Anal. Biochem.* **2006**, 355, 157–164.
- [537] S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault, H.-A. Tajmir-Riahi, *J. Mol. Struct.* **2007**, 827, 35–43.
- [538] B. F. Cain, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 658–668.
- [539] E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita, M. Sawamura, S. Jinno, H. Okayama, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4424–4427.
- [540] J. P. Clamme, J. Azoulay, Y. Mély, *Biophys. J.* **2003**, 84, 1960–1968.
- [541] E. V. B. van Gaal, R. van Eijk, R. S. Oosting, R. J. Kok, W. E. Hennink, D. J. A. Crommelin, E. Mastrobattista, *J. Controlled Release* **2011**, 154, 218–232.
- [542] G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, 1838, 1451–1466.
- [543] N. A. Alhakamy, A. Kaviratna, C. J. Berkland, P. Dhar, *Langmuir* **2013**, 29, 15336–15349.
- [544] J. O'brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5421–5426.
- [545] S. N. Rampersad, *Sensors* **2012**, 12, 12347–12360.
- [546] R. Hamid, Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh, P. Bullock, *Toxicol. In Vitro* **2004**, 18, 703–710.
- [547] G. Repetto, A. del Peso, J. L. Zurita, *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 1125–1131.
- [548] D. A. Dougherty, *J. Nutr.* **2007**, 137, 1504S–1508S.
- [549] A. K. Bronowska, *Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design*, INTECH Open Access Publisher, **2011**.
- [550] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* **1999**, 12, 3–18.
- [551] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, *J. Recept. Signal Transduct.* **2004**, 24, 1–52.
- [552] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930.
- [553] D. Rugar, P. Hansma, *Phys. Today* **1990**, 43, 23–30.
- [554] C. Rivetti, M. Guthold, C. Bustamante, *J Mol Biol* **1996**, 919–932.
- [555] H. Kuchelmeister, *Molecular Recognition of Biologically Relevant Targets*, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie» Organische Chemie, **2011**.
- [556] C. L. Grigsby, K. W. Leong, *J. R. Soc. Interface* **2010**, 7, S67–S82.
- [557] O. Rosorius, P. Heger, G. Stelz, N. Hirschmann, J. Hauber, R. H. Stauber, *Biotechniques* **1999**, 27, 350–355.

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis

#### Multivalente Liganden





**Allgemeine Abkürzungen, Maßeinheiten, Konstanten**

°	Grad	$K_D$	Dissoziationskonstante
$\beta$	beta	$K_{Dapp}$	scheinbare Dissoziationskonstante
$\delta$	Chemische Verschiebung	L	Liter
$\Delta H$	Enthalpie	m	Meter
$\Delta G$	Gibbs Energie	m-	Milli-
$\Delta S$	Enthopie	M	Molar
$\epsilon$	Spezifischer Extinktionskoeffizient	min	Minuten
$\lambda$	Wellenlänge	n	Stöchiometrie
$\mu$	mikro-	n-	Nano-
$\pi$	pi	pH	<i>pondus hydrogenii</i>
$\zeta$	zeta	$pK_s$	Säurekonstante
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl	pdb	<i>protein data bank</i>
Å	Angström	PPI	Protein-Protein-Interaktion
Äq.	Äquivalente	ppm	<i>parts per million</i>
Ac	Acetyl	R	Allgemeine Gaskonstante
bzw.	beziehungsweise	Rf.	Retentionsfaktor
C	Celsius	RP	<i>Reversed phase</i>
cm	Zentimeter	rpm	<i>rounds per minute</i>
d	duplett	s	Sekunde/Singulett
Da	Dalton	t	Zeit
EC <sub>50</sub>	Halb-maximale Effektor Konzentration	r	Anisotropie
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde	T	Temperatur
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	UV	Ultraviolett
IC <sub>50</sub>	Halb-maximale Inhibitor Konzentration	V	Volumen
IP	Isoelektrischer Punkt	Vis	visible
k	Kilo-	WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
K	Kelvin	z	Ladung
$K_A$	Assoziationskonstante	z. B.	zum Beispiel
		z. T.	zum Teil

**Aminosäuren**

Ala, A	Alanin	Leu, L	Leucin
Asn, N	Asparagin	Lys, K	Lysin
Asp, D	Asparaginsäure	Met, M	Methionin
Arg, R	Arginin	Phe, F	Phenylalanin
Cys, C	Cystein	Pro, P	Prolin
Gln, Q	Glutamin	Ser, S	Serin
Glu, E	Glutaminsäure	Thr, T	Threonin
Gly, G	Glycin	Trp, W	Tryptophan
His, H	Histidin	Tyr, Y	Tyrosin
Ile, I	Isoleucin	Val, V	Valin

**Biomoleküle**

ADP	Adenosindiphosphat	GMP	Guanosinmonophosphat
AMP	Adenosinmonophosphat	HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor 1<math>\alpha</math></i>

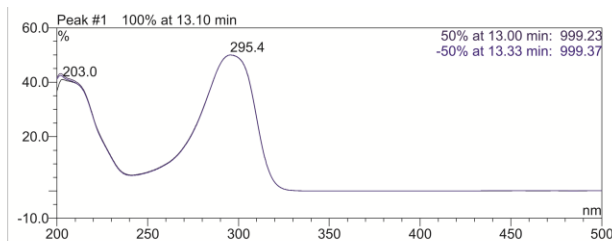
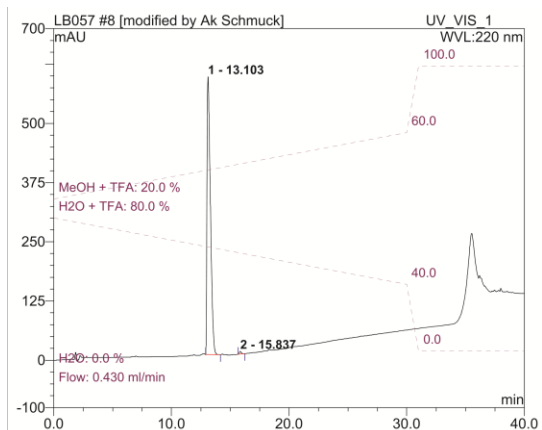
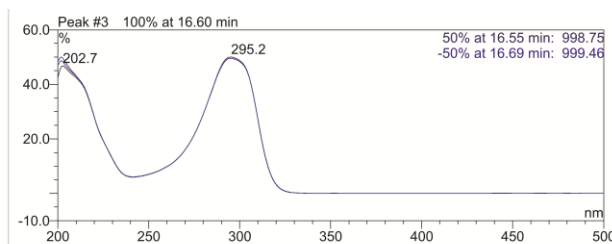
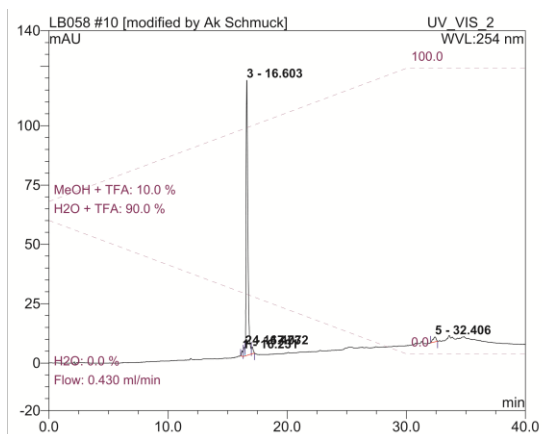
ATP	Adenosintriphosphat	IGF-I	Insulin-abhängiger Wachstumsfaktor
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>	MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
Bak	Proapoptotisches Protein	MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
BET	<i>Bromodomain and extraterminal domain</i>	NFT	Neurofibrillare Tangles
BRD	Bromodomäne	pDNS	Plasmid DNS
CDC	Cyclin-abhängige Proteinkinasen	P53	Tumorsuppressorgen
Cas9	<i>CRISP-associated proteins</i>	PAMAM	Polyamidoamin
CN-A	Cotylenin A	PKB	Proteinkinase B
CPP	<i>Cell penetrating peptide</i>	PP5	Protein Phosphatase 5
CRISP	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	pS	phosphoryliertes Serin
CsA	Cyclosporin A	pT	phosphoryliertes Threonin
ctDNS	<i>calf thymus</i> DNS	RAF	Rapidly accerated fibrosarcoma
DNS	Desoxyribonukleinsäure	RAS	<i>rat sarcoma</i>
ER $\alpha$	Östrogen Rezeptor $\alpha$	RNS	Ribonukleinsäure
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinases</i>	Tiam 1	<i>T-lymphoma invasion and metastasis inducing protein</i>
FC-A	Fusicoccin A	UMP	Uridinmonophosphat
FOXO	<i>Forkhead box O1</i>	VHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor
GEF	<i>Guanin exchange factor</i>		

### Chemikalien und Reagenzien

Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid	MBHA	p-Methylbezhydrylamin
Alloc	Allyloxycarbonyl-Gruppe	NaOH	Natriumhydroxid
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Gruppe	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Bis-Tris-Puffer	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan-Puffer	PEI	Polythylenimin
CBS	Carboxylat binding site	Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
DCM	Dichlormethan	PEG	Polyethylenglycol
DIPEA	Diisopropylethylamin	PhSiH <sub>3</sub>	Phenylsilan
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid	Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-solfonyl
DMSO	Dimethylsulfoxid	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium Hexafluorophosphat
Fmoc	9-Fluorenyl-methyloxycarbonyl-Gruppe	SiO <sub>2</sub>	Silikagel
GCP	Guanidiniocarbonylpyrrol	TIS	Triisopropylsilan
HCTU	1-(Bis-dimethylaminomethylen)-5-chloro-3-oxy-1H-benzotriazol-1-ium Hexafluorophosphat	TFA	Trifluoressigsäure
MeOH	Methanol		

**Spektroskopische / analytische Geräte und Methoden**

AFM	<i>Atomoc force microcospy</i>	MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i>
DLS	dynamische Lichtstreuung	MS	Massenspektrometrie
FP	Fluoreszenzpolarisation	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie	SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
IR	Infrarotspektrometrie	SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>

**9.2. HPLC-Läufe****Abbildung 109.** Analytischer HPLC Lauf von **57** mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 1 bei 220 nm.**Abbildung 110.** Analytischer HPLC Lauf von **58** mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 3 bei 220 nm.

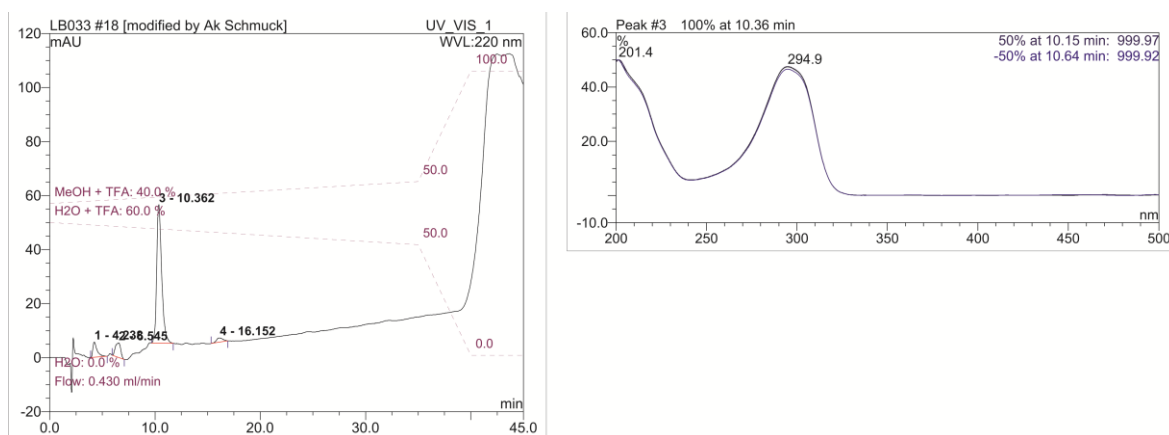


Abbildung 111. Analytischer HPLC Lauf von 59 mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 3 bei 220 nm.

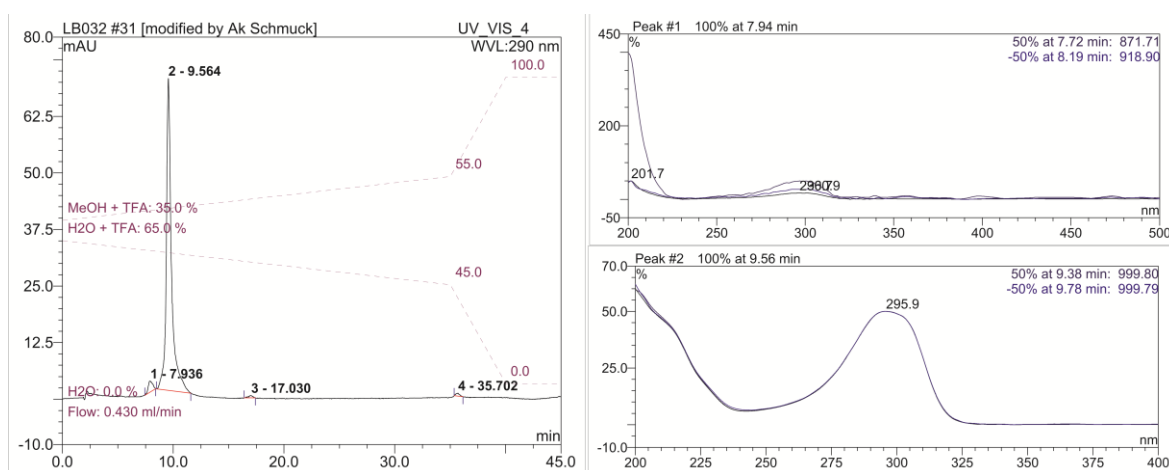


Abbildung 112. Analytischer HPLC Lauf von 61 mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 1 und 2 bei 290 nm.

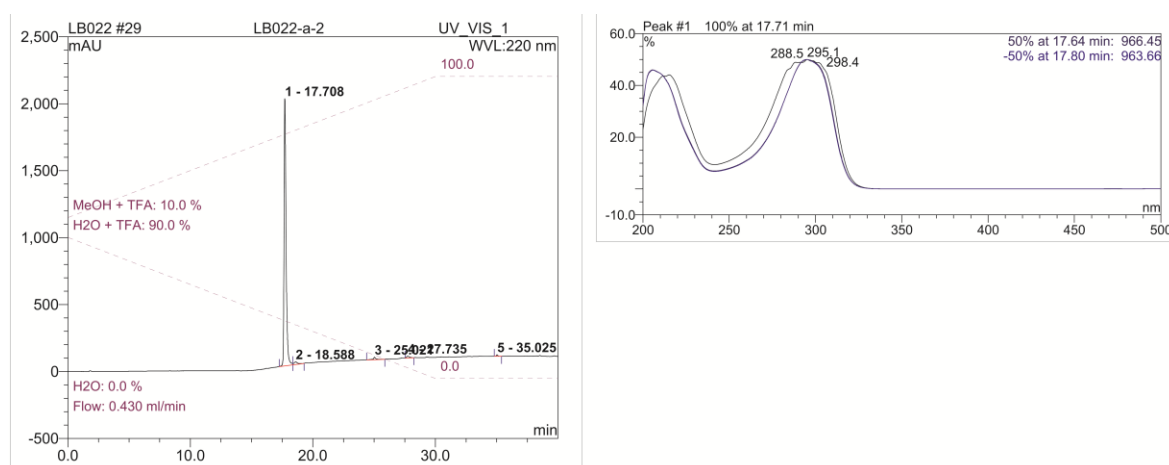


Abbildung 113. Analytischer HPLC Lauf von 45 mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 1 bei 220 nm.

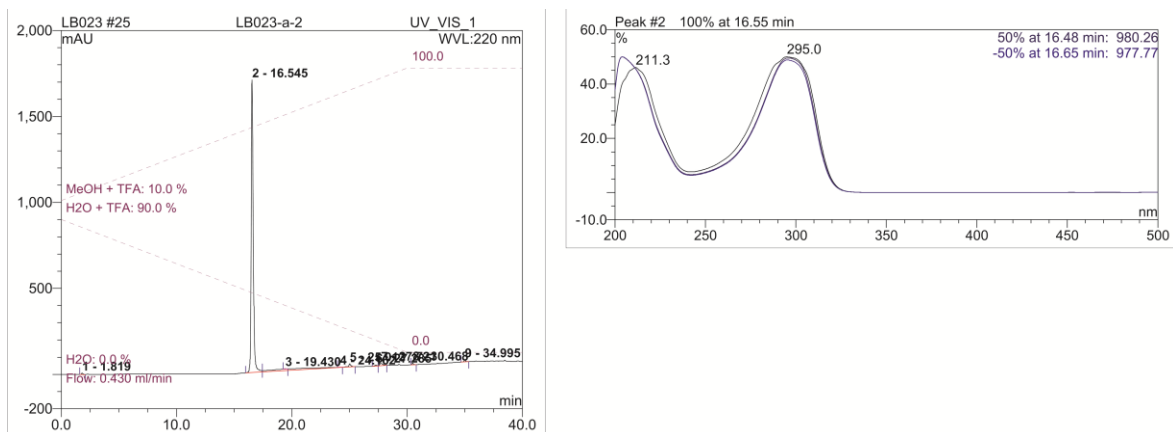


Abbildung 114. Analytischer HPLC Lauf von 62 mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 2 bei 220 nm.

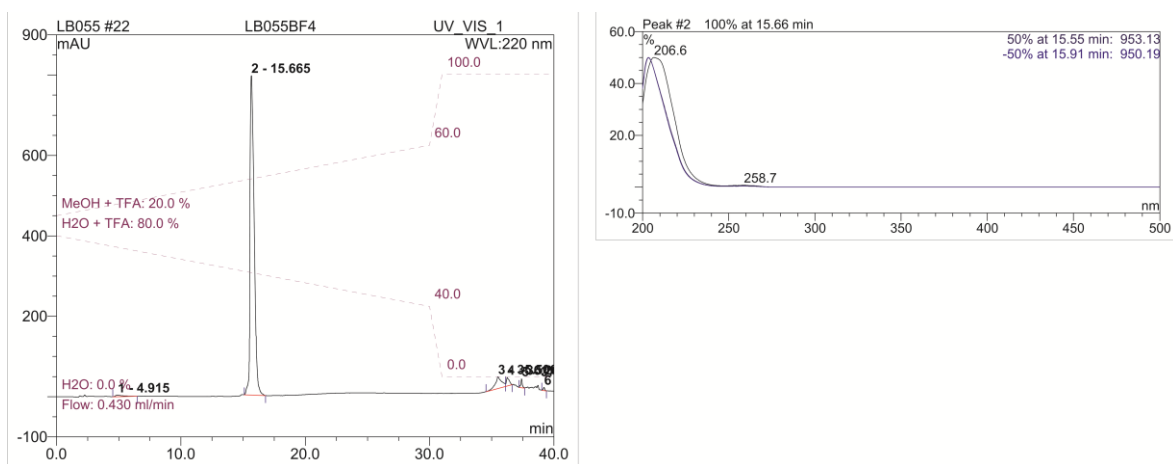


Abbildung 115. Analytischer HPLC Lauf von 73 mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 2 bei 220 nm.

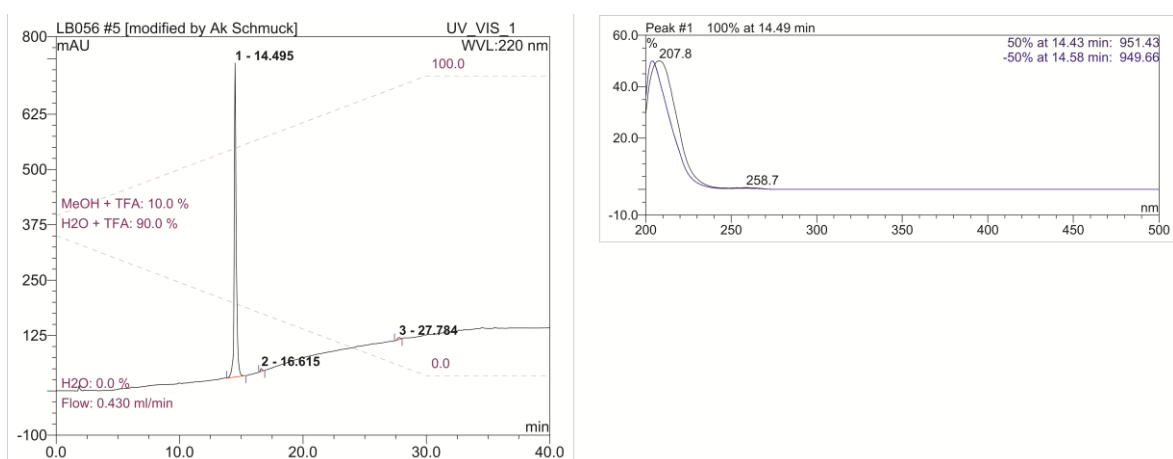


Abbildung 116. Analytischer HPLC Lauf von 72 mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 1 bei 220 nm.

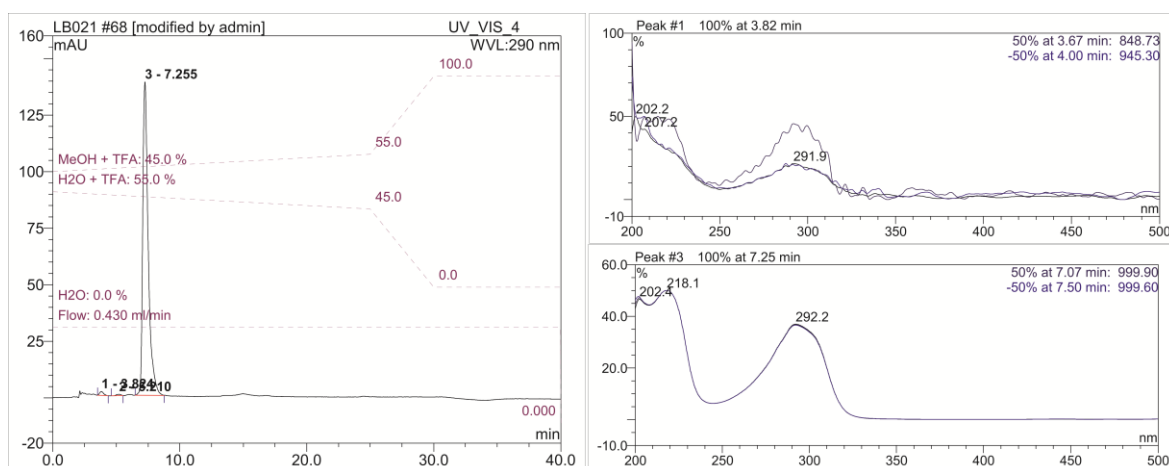


Abbildung 117. Analytischer HPLC Lauf von **76** mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 1 und 3 bei 290 nm.

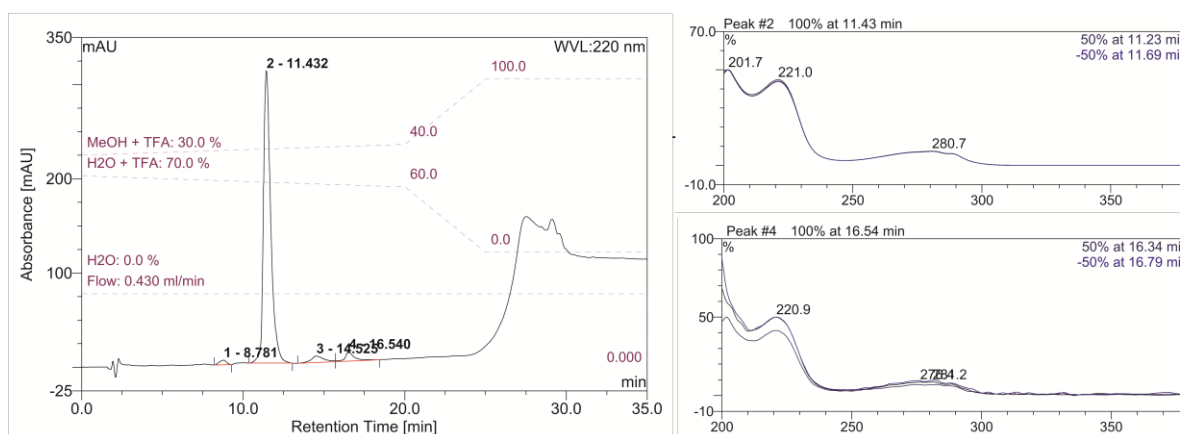


Abbildung 118. Analytischer HPLC Lauf von **75** mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 2 und 4 bei 220 nm.

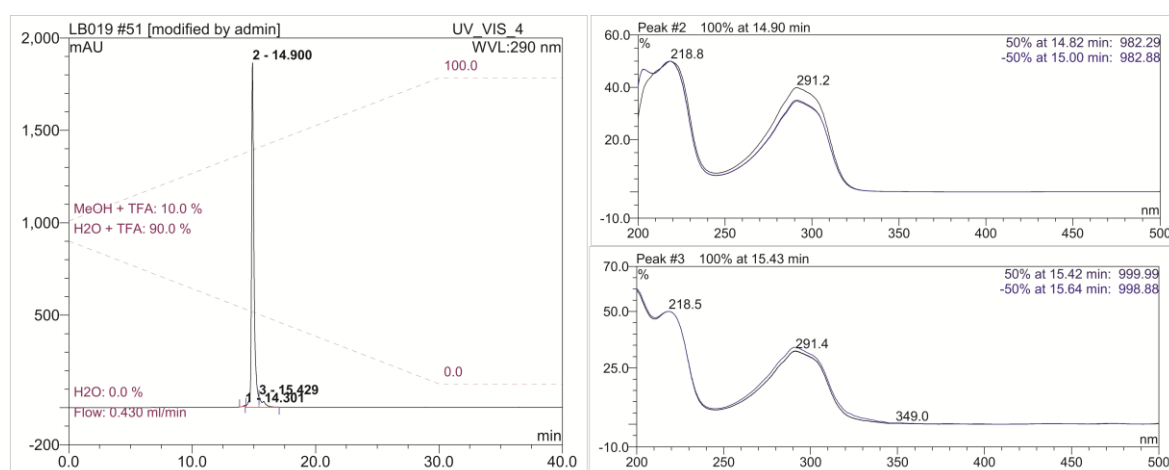
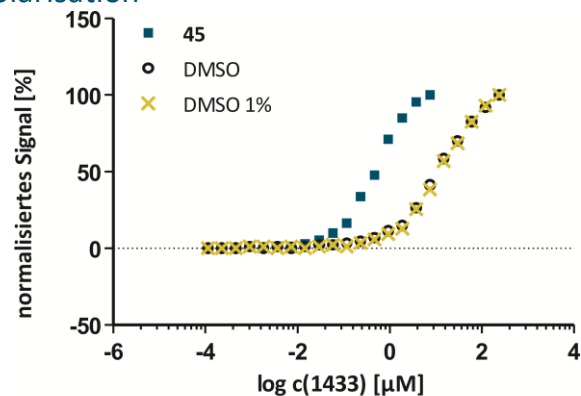


Abbildung 119. Analytischer HPLC Lauf von **77** mit zugehörigem UV/Vis Spektrum von Peak 2 und 3 bei 290 nm.

### 9.3. Fluoreszenzpolarisation



	45	DMSO	DMSO 1%
Kd	0.6140	9.931	10.07

Abbildung 120. DMSO Kontrolle.

### 9.4. ITC-Kontrolllexperimente

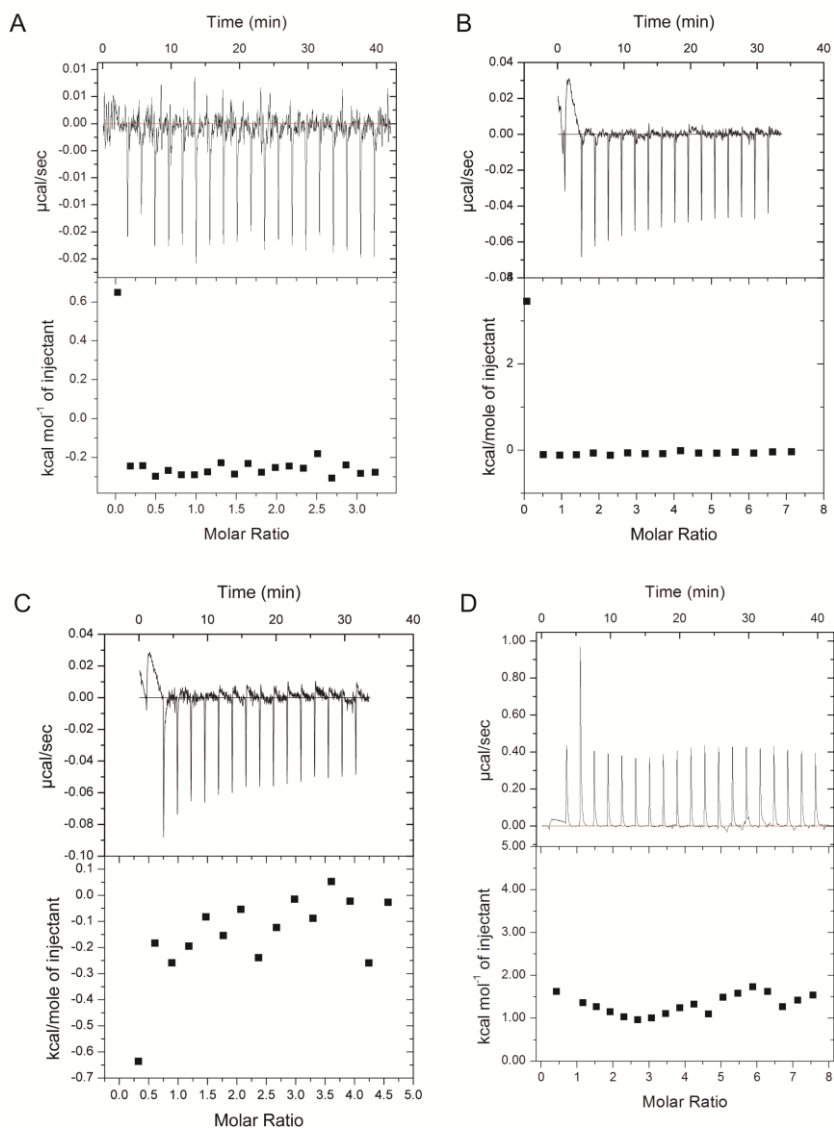
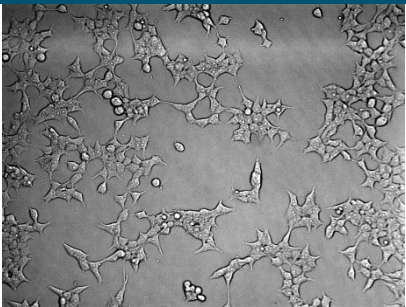
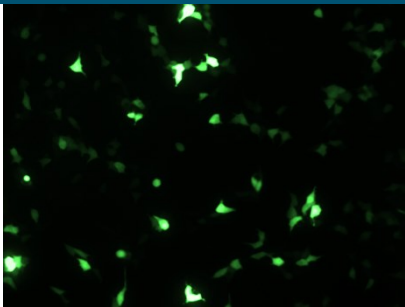
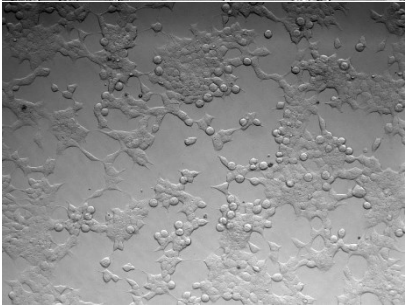
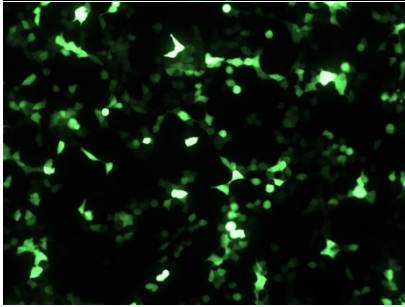


Abbildung 121. ITC Kontrollen. A) Puffer zu 14-3-3, B) C-RAF zu Puffer, C) Tau Protein zu Puffer, D) 45 zu Puffer.

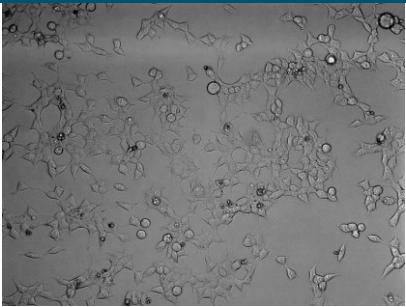
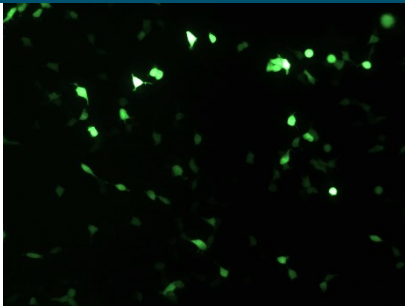
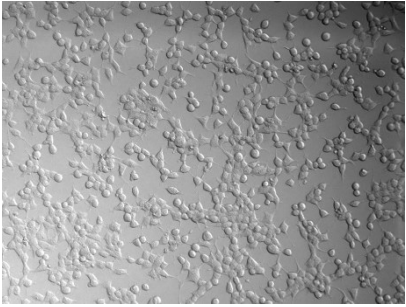
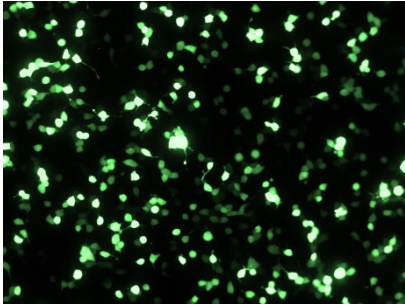


## 9.5. Transfektion

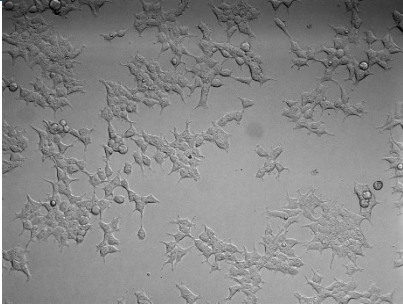

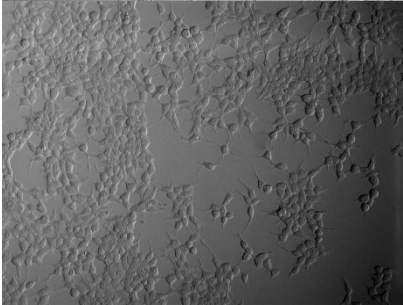

**Tabelle 27.** Lipofectamin Kontrolle; HEK293T Zellen

Lipofectamin	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

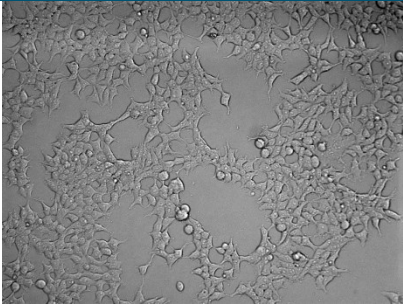
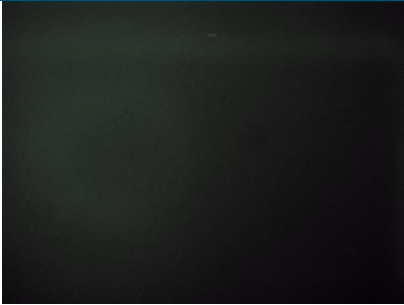
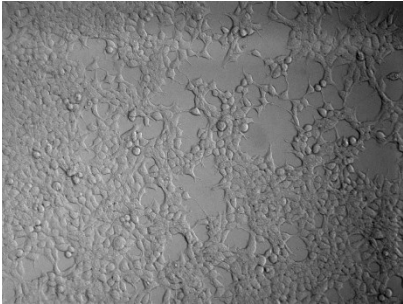

**Tabelle 28.** PEI Kontrolle

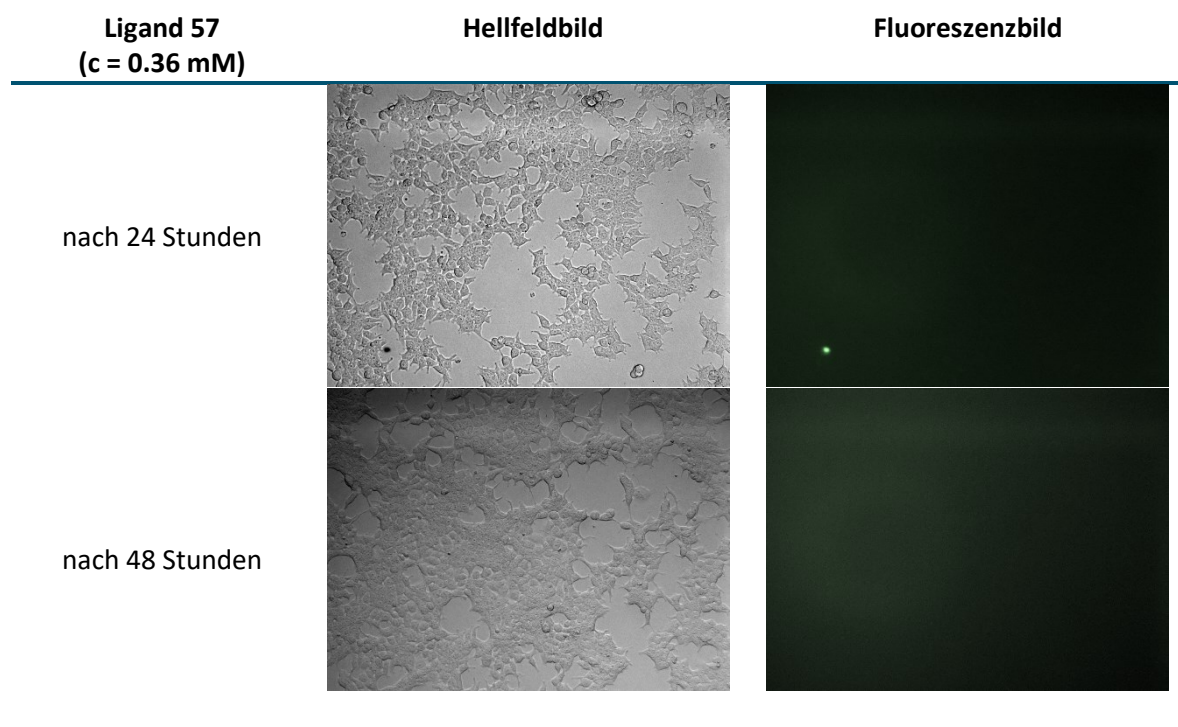
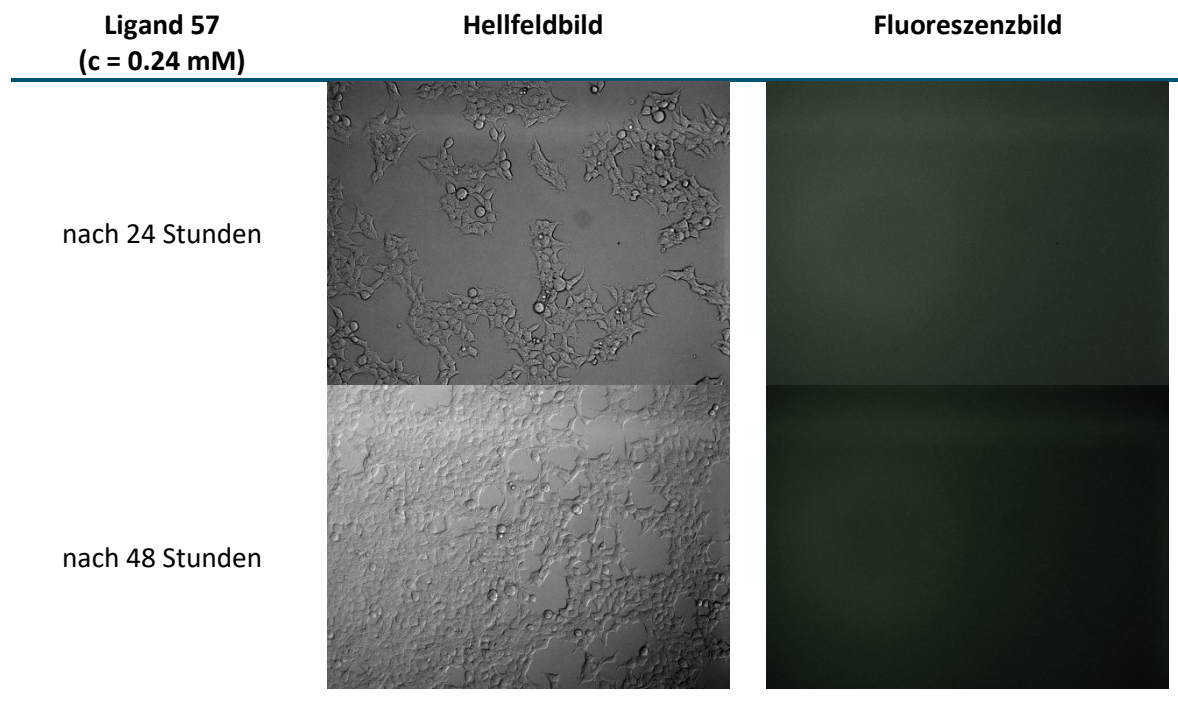
PEI	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

**Tabelle 29.** Transfektion Ligand 57, HEK293T Zellen

Ligand 57 (c = 0.06 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

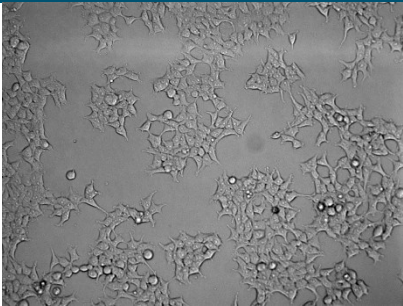
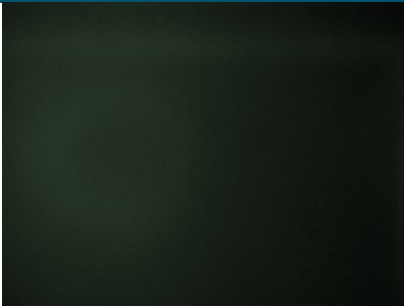
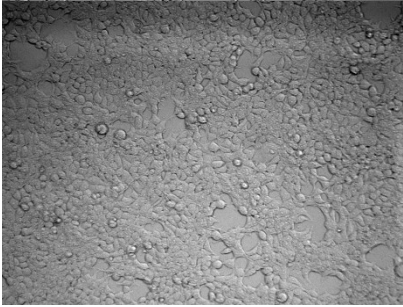
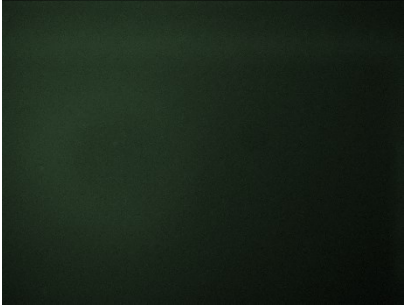
  

Ligand 57 (c = 0.12 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

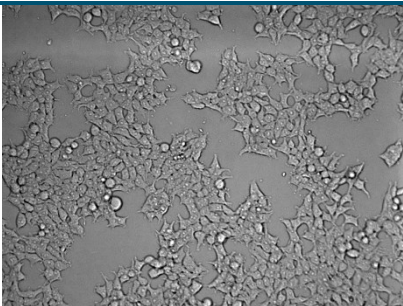
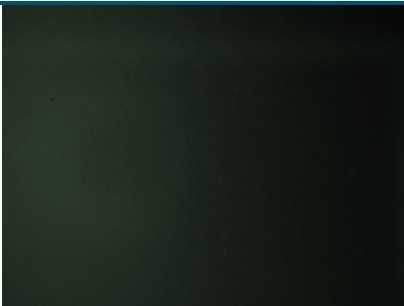
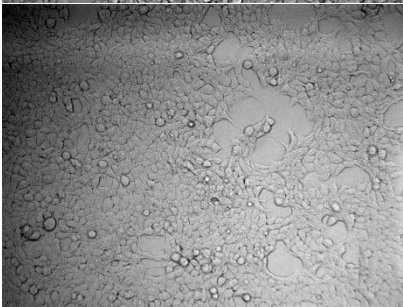
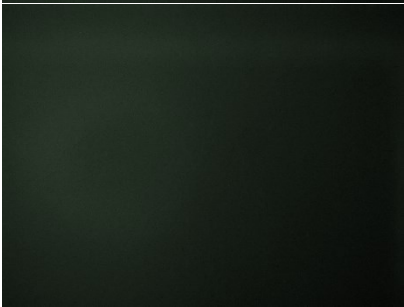


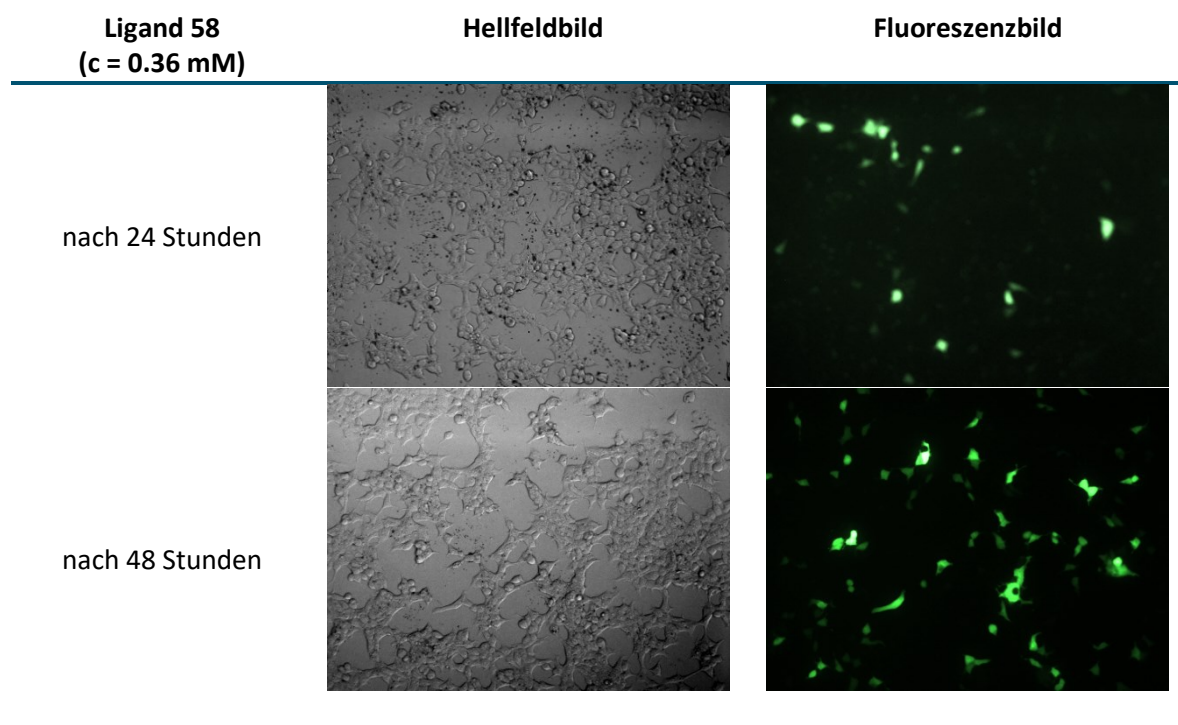
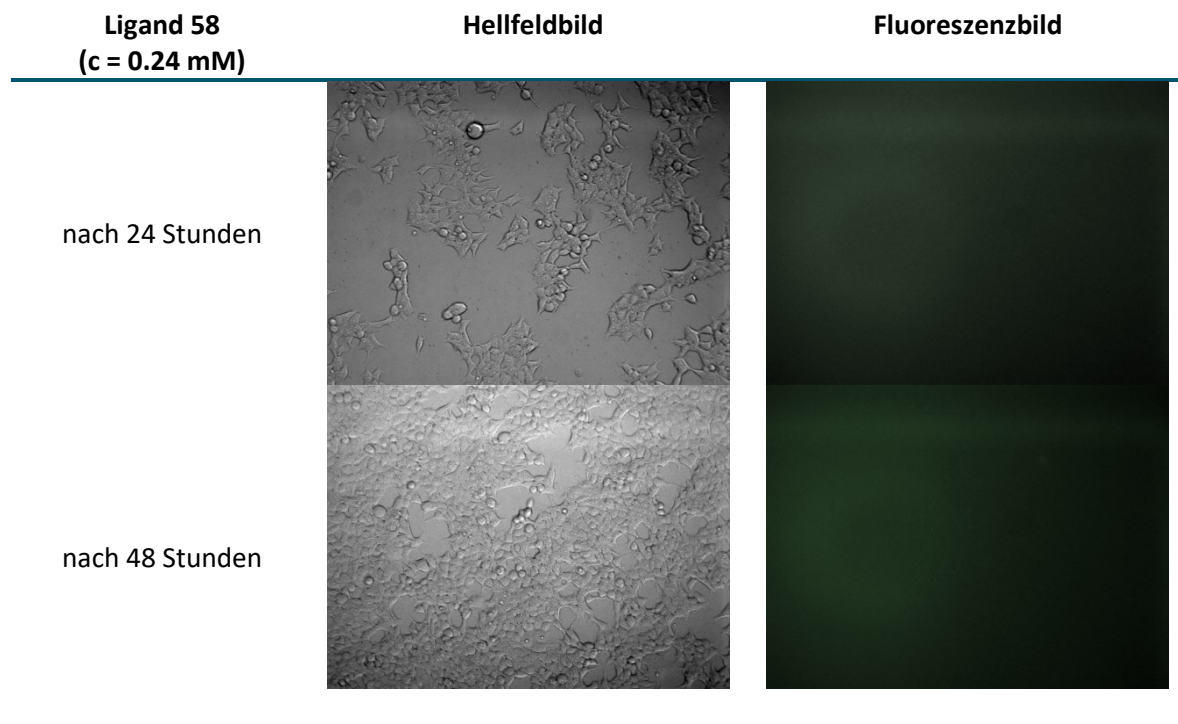


**Tabelle 30.** Transfektion Ligand **58**, HEK293T Zellen

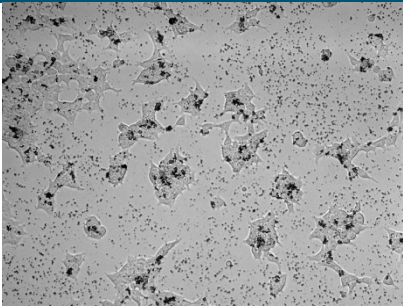
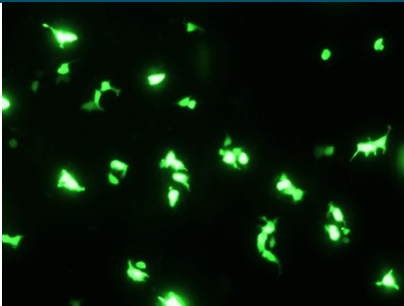
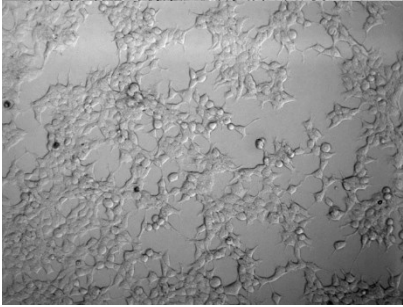
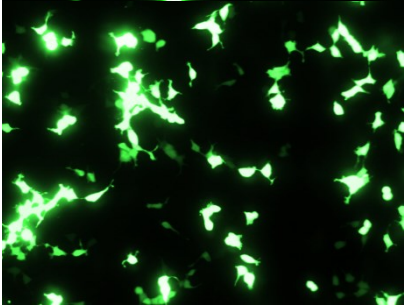
Ligand 58 (c = 0.06 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

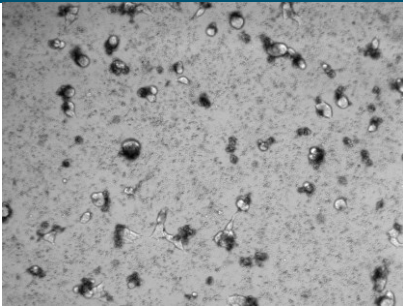

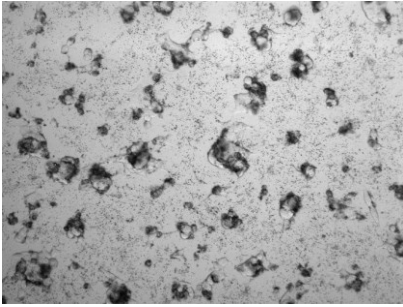
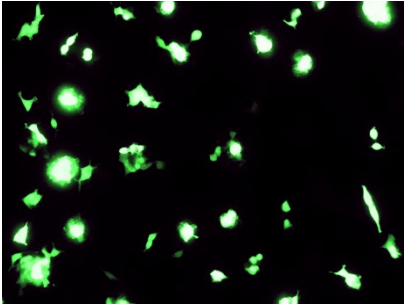
Ligand 58 (c = 0.12 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		



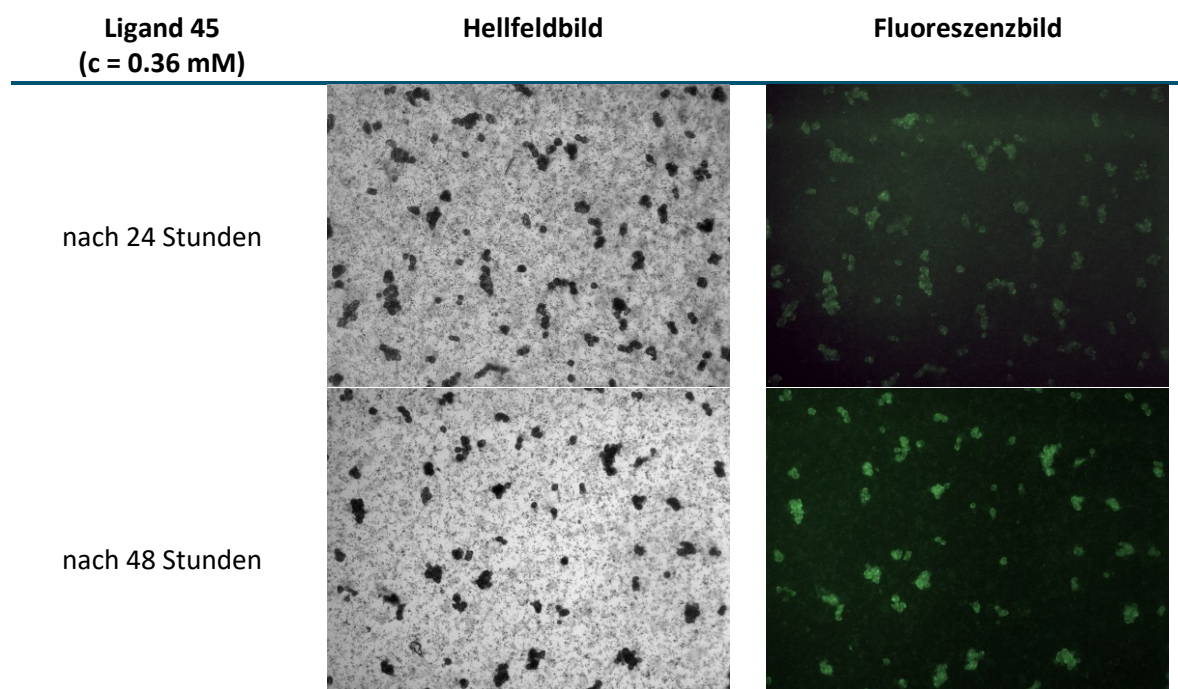
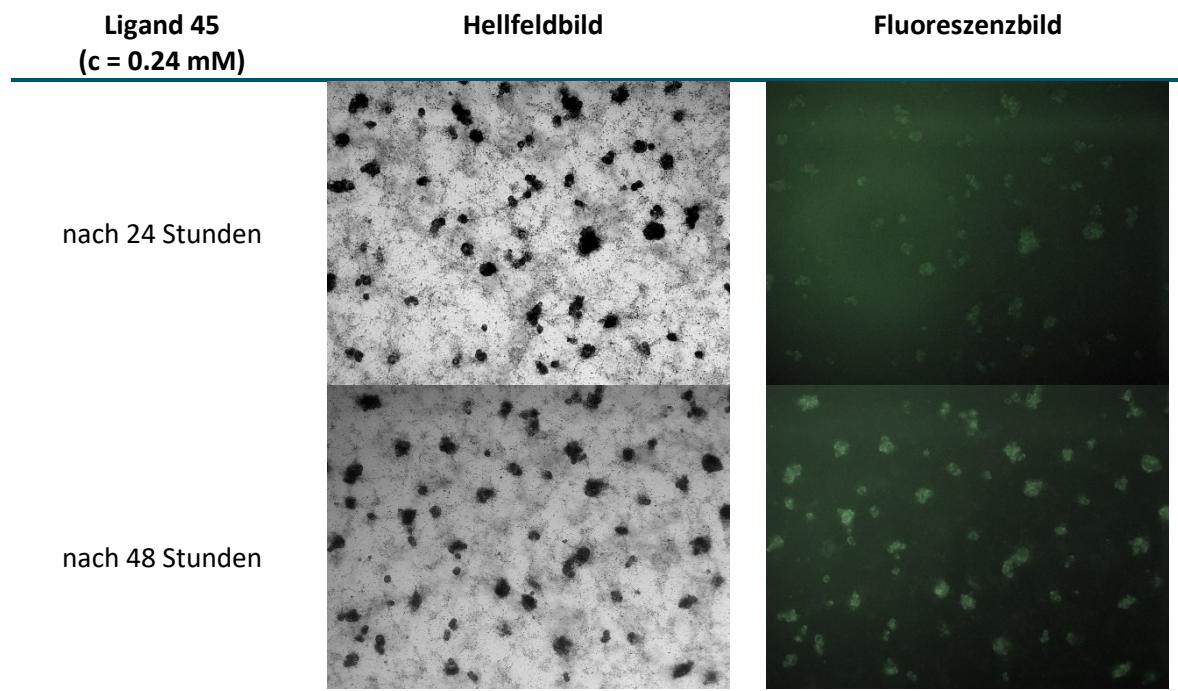
**Tabelle 31.** Transfektion Ligand 45, HEK293T Zellen

Ligand 45 (c = 0.06 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

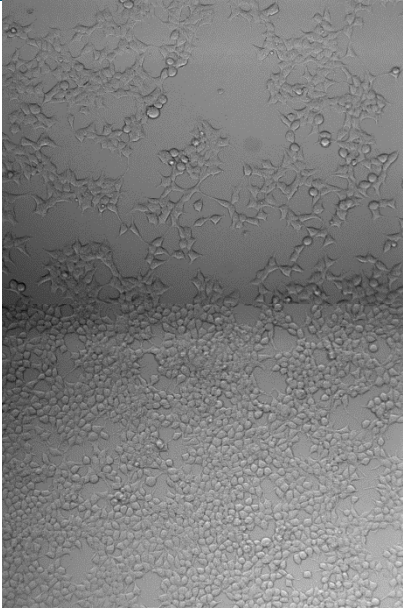

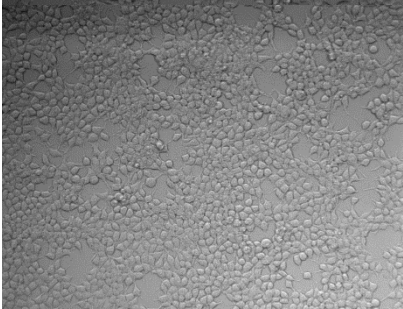

Ligand 45 (c = 0.12 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		



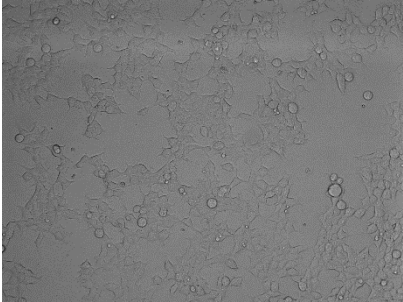





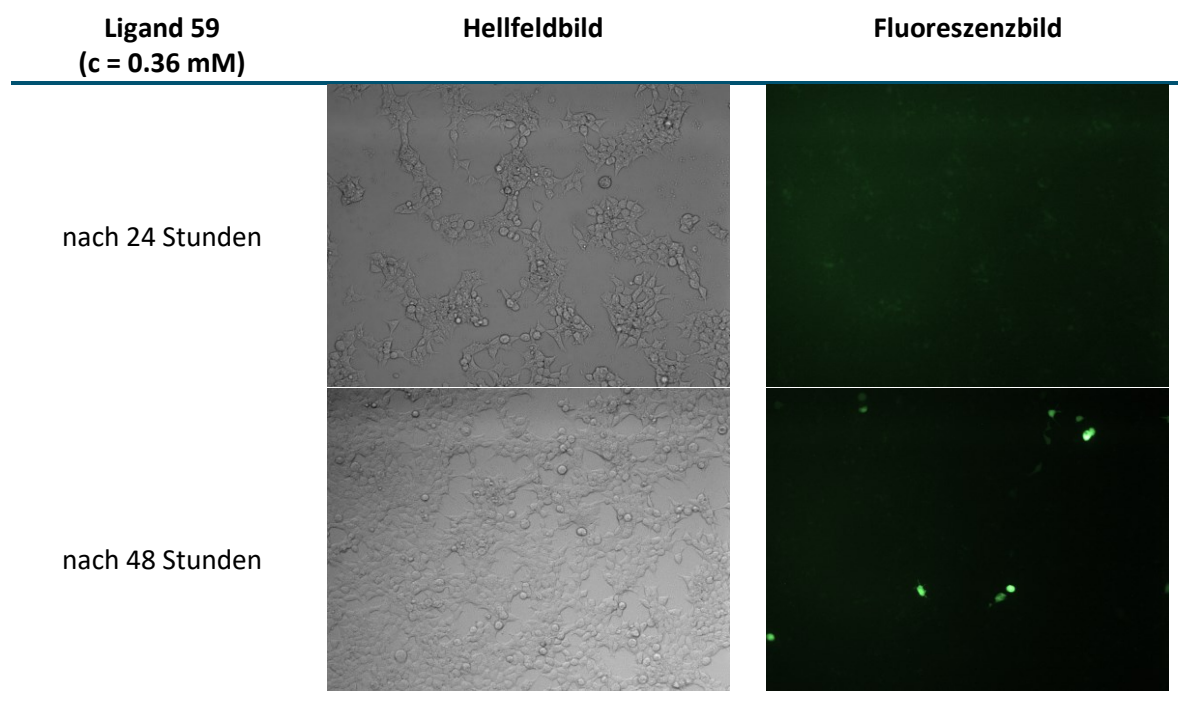
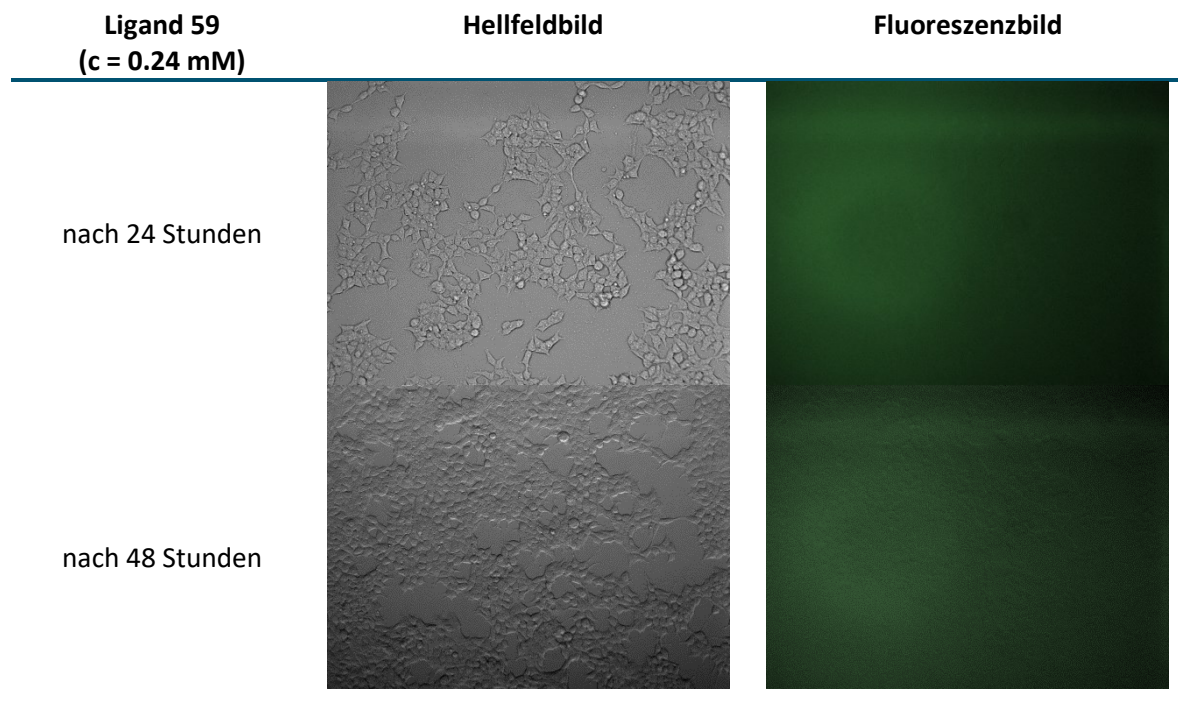


**Tabelle 32.** Transfektion Ligand 59, HEK293T Zellen


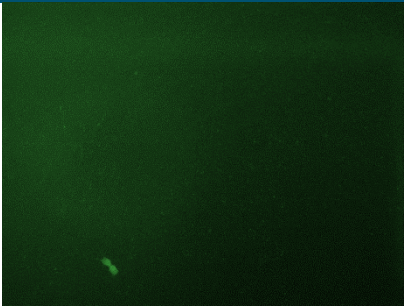
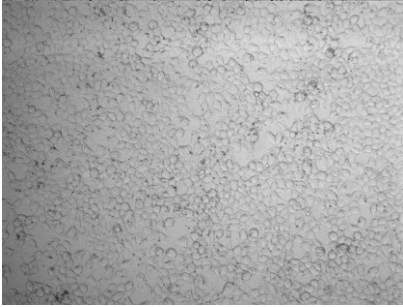

Ligand 59 (c = 0.06 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

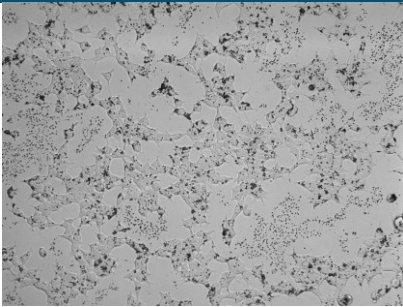
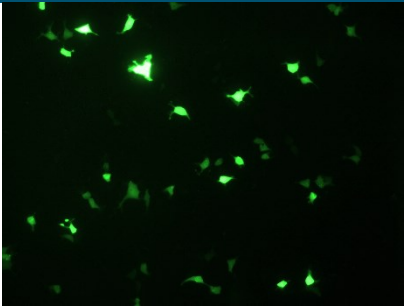

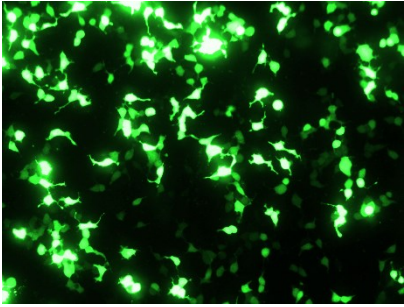
Ligand 59 (c = 0.12 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		



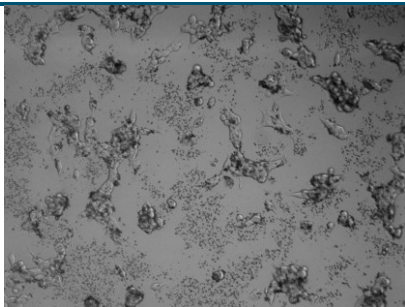
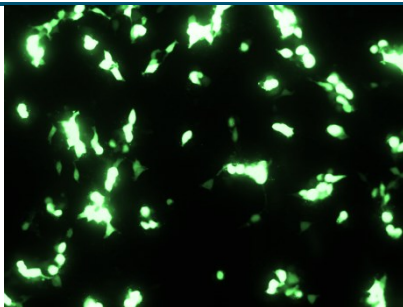
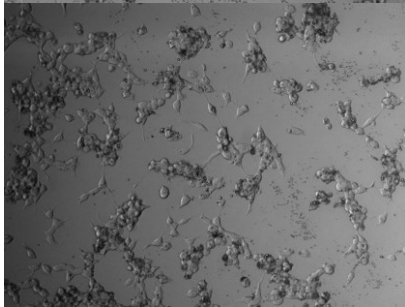
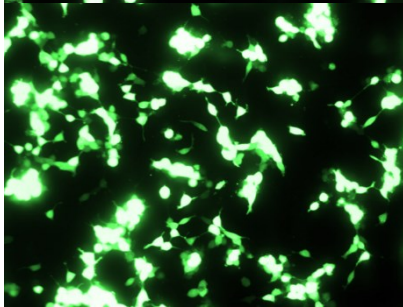
**Tabelle 33.** Transfektion Ligand **62**, HEK293T Zellen

Ligand <b>62</b> (c = 0.06 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

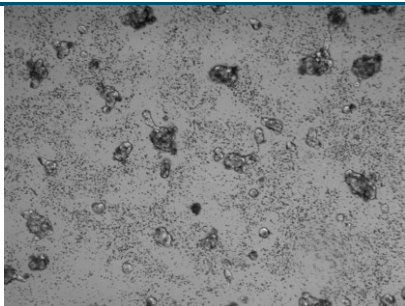
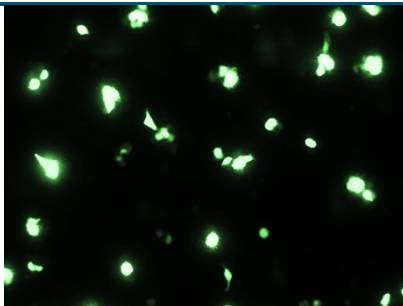
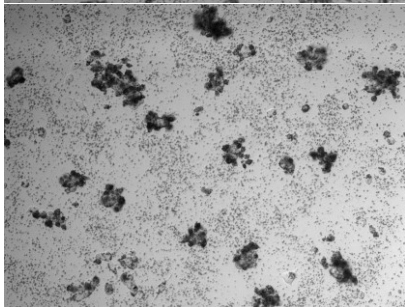
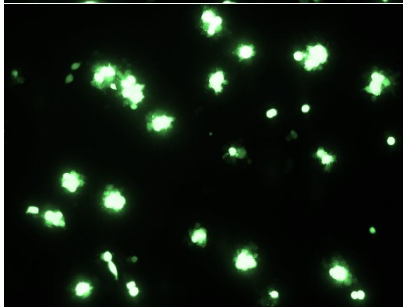
  

Ligand <b>62</b> (c = 0.12 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

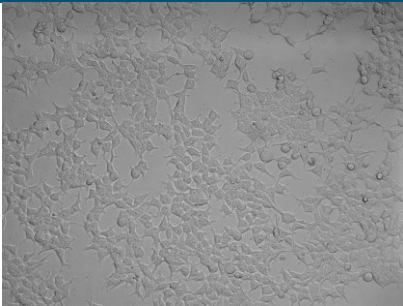


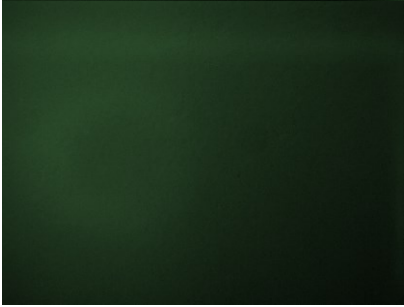


Ligand 62 (c = 0.24 mM)		Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden			
nach 48 Stunden			

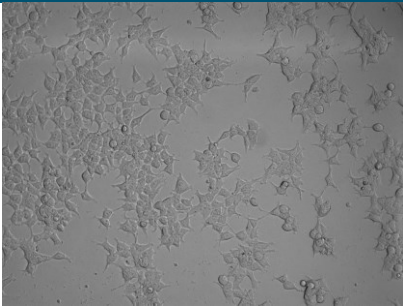
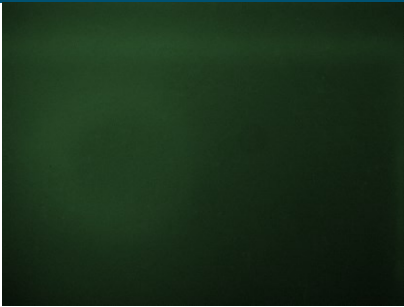
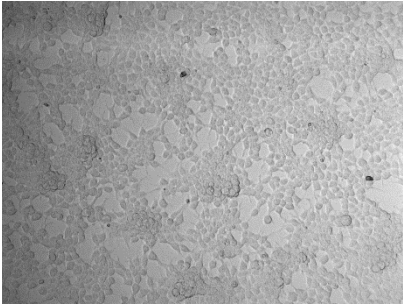
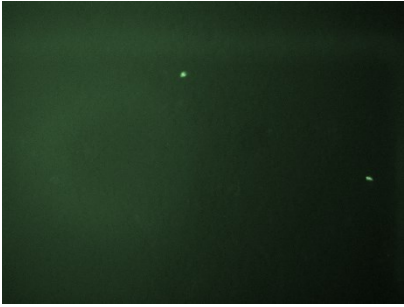
  

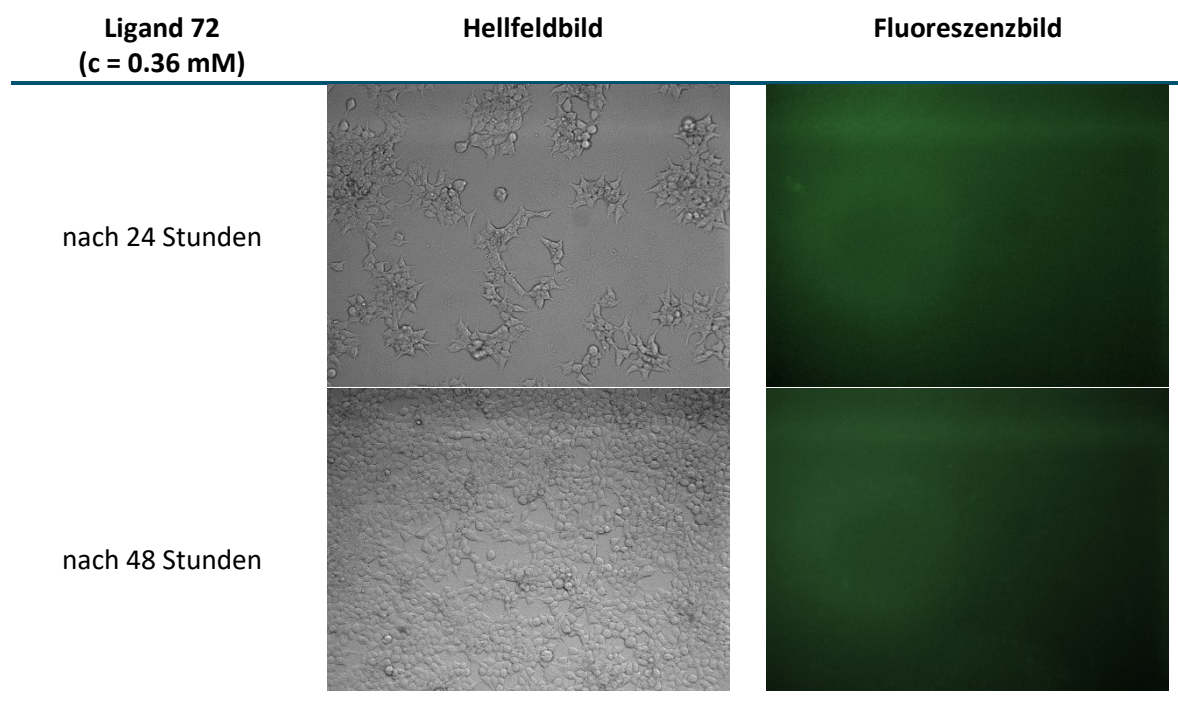
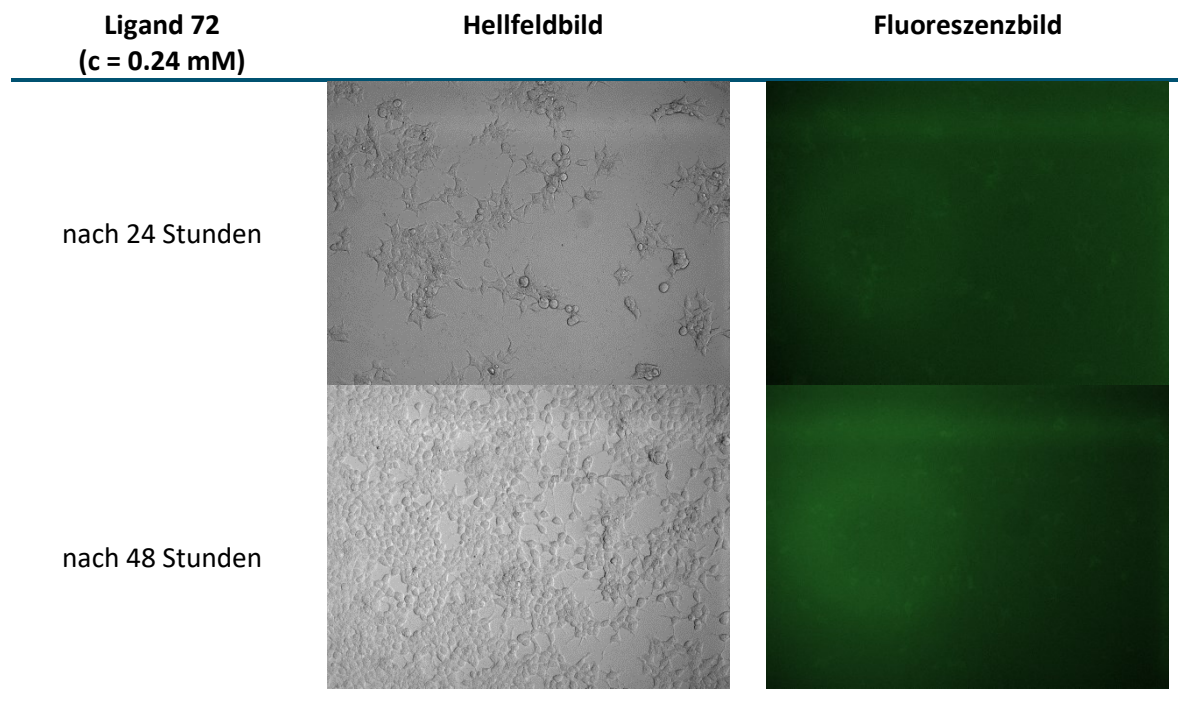
Ligand 62 (c = 0.36 mM)		Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden			
nach 48 Stunden			

**Tabelle 34.** Transfektion Ligand **72**, HEK293T Zellen

Ligand 72 (c = 0.06 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		

Ligand 72 (c = 0.12 mM)	Hellfeldbild	Fluoreszenzbild
nach 24 Stunden		
nach 48 Stunden		



## 9.6. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.









